

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA**

Luiz Augusto Rosa

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO CÓRTEX ORBITOFRONTAL,
ÍNSULA E CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR NA MODULAÇÃO
DA ANSIEDADE INDUZIDA PELO MODELO DE TRANSTORNO
DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO EM CAMUNDONGOS**

**SÃO CARLOS, SP
2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA**

Luiz Augusto Rosa

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO CÓRTEX ORBITOFRONTAL,
ÍNSULA E CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR NA MODULAÇÃO
DA ANSIEDADE INDUZIDA PELO MODELO DE TRANSTORNO
DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO EM CAMUNDONGOS**

Texto para o Exame de Defesa de
Doutorado no Programa de Pós-
graduação em Psicologia.

Linha 3: Neurociência Comportamental
e Cognitiva da Universidade Federal de
São Carlos.

Orientação: Profa. Dra. Azair Liane
Matos do Canto de Souza

**São Carlos, SP
2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Educação e Ciências Humanas
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Relatório de Defesa de Tese Candidato: Luiz Augusto Rosa

Aos 22/02/2024, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Psicologia, a defesa de tese de doutorado sob o título: Avaliação do papel do córtex orbitofrontal, ínsula e córtex cingulado anterior na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de transtorno de estresse pós-traumático em camundongos, apresentada pelo candidato Luiz Augusto Rosa. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca	Função	Instituição	Conceito
Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza	Presidente	UFSCar	<u>A</u>
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin	Titular	UNESP	<u>A</u>
Prof. Dr. Luiz Fernando Takase	Titular	UFSCar	<u>A</u>
Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira	Titular	UFSCar	<u>A</u>
Prof. Dr. Diego Cardozo Mascarenhas	Titular	FEBASP	<u>A</u>

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora*:

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Azair Liane Matos do Canto de Souza, representante do Programa de Pós-Graduação em Psicologia, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Azair Liane Matos do Canto de Souza

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase

Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira

Prof. Dr. Diego Cardozo Mascarenhas

Azair Liane Matos do Canto de Souza

Representante do PPG: Azair Liane Matos do Canto de Souza

Não houve alteração no título Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

Observações:

a) Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

b) Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Psicologia, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dra. Azair por ter aceitado a me orientar, e pela paciência e parceria em todo processo.

Aos meus amigos de laboratório, Lara, Anna Cecília, Isabela, Lígia, Giovana, Paulo e Daniela, por toda ajuda, ensinamentos e cooperação.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição para a leitura desta tese.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia (PPGpsi-UFSCar), pela oportunidade da realização dos estudos e pesquisas necessários para minha formação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº2017/27025-4), pelo apoio financeiro concedido para desenvolver este trabalho e divulgá-lo em congressos científicos.

O presente trabalho também recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Introdução.....	5
Classificação do Transtorno de Estresse Pós-traumático.....	5
Epidemiologia.....	7
Militares.....	7
População geral (civis).....	8
Memória e TEPT.....	9
Correlatos neurais e cognitivos do TEPT.....	10
Modelos Animais.....	14
Estressores psicológicos.....	14
Estressores físicos.....	15
Hipótese.....	16
Objetivo geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
Material e Método.....	18
Sujeitos.....	18
Drogas.....	18
Cirurgia estereotáxica.....	18
Microinjeção de cloreto de cobalto.....	19
Microinjeção de midazolam.....	20
Equipamentos.....	20
Caixa claro-escuro.....	20
Labirinto em cruz elevado.....	21
Histologia.....	22
Procedimentos.....	23
Análise estatística.....	27
Resultados.....	28
Córtex cingulado anterior.....	28
Experimento 1.....	29
Experimento 2.....	36
Córtex orbitofrontal.....	43
Experimento 3.....	45
Experimento 4.....	53
Ínsula.....	61
Experimento 5.....	62
Experimento 6.....	69
Discussão.....	79
Conclusão.....	89
Referências.....	90

LISTAS DE FIGURAS

Figura A.....	22
Figura B.....	23
Figura C.....	26
Figura 1.....	30
Figura 2.....	33
Figura 3.....	37
Figura 4.....	39
Figura 5.....	43
Figura 6.....	44
Figura 7.....	45
Figura 8.....	47
Figura 9.....	51
Figura 10.....	53
Figura 11.....	58
Figura 12.....	60
Figura 13.....	61
Figura 14.....	66
Figura 15.....	68
Figura 16.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	6
Tabela 2.....	35
Tabela 3.....	41
Tabela 4.....	49
Tabela 5.....	56
Tabela 6.....	64
Tabela 7.....	71

LISTAS DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CCA	Córtex Cingulado Anterior
CCE	Caixa Claro-Escuro
CCHO	Com Choque
CoCl₂	Cloreto de Cobalto
COF	Córtex Orbitofrontal
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EBA	Entradas nos Braços Abertos
EBF	Entrada nos Braços Fechados
ELE	Entradas no Lado Escuro
GABA_A	Ácido Gama-Aminobutírico A
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
mA	Miliampere
MDZ	Midazolam
SAP	<i>Stretch-Attend Posture</i>
SCHO	Sem Choque
TBA	Tempo nos Braços Abertos
TC	Tempo no Centro
TEPT	Transtorno de Estresse Pós-Traumático
TLE	Tempo no Lado Escuro

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO PAPEL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL, ÍNSULA E CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE INDUZIDA PELO MODELO DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 3047280318, sob a responsabilidade de **Profª Drª Azair Liane Matos do Canto de Souza e equipe; Luiz Augusto Rosa; Lara Maria Silveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 16/04/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE ROLE OF THE PRE-FRONTAL CORTEX, INSULA, AND ANTERIOR CINGULATE CORTEX IN THE MODULATION OF ANXIETY INDUCED BY THE POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER MODEL IN MICE", utilizing 444 Heterogenics mice (444 males), protocol number CEUA 3047280318, under the responsibility of **Profª Drª Azair Liane Matos do Canto de Souza and team; Luiz Augusto Rosa; Lara Maria Silveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 04/16/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **03/2021**

Área: **Psicologia**

Origem: **Biotério Central da UFSCAR**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 6 semanas**

N: **444**

Linhagem: **Suíço albino**

Peso: **21 a 30 g**

Resumo: Inúmeros estudos têm demonstrado que estados de ansiedade, apesar de estarem positivamente correlacionados com hiperativação da amígdala e ínsula, estão correlacionados com hipoatividade generalizada no córtex pré-frontal (correlação negativa), o que tem sido chamado de hipofrontalidade em estados de ansiedade. Alguns estudos têm mostrado que pacientes com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), apresentam hipoatividade pré-frontal generalizada, principalmente no córtex pré-frontal ventromedial, CCA rostral e no giro frontal medial, tanto em tarefas relacionadas com o trauma quanto em tarefas não relacionadas com o trauma. Como ainda não há consenso na literatura sobre por que e como que isso ocorre, o nosso objetivo será investigar a participação do córtex pré-frontal (CPF) e da ínsula na modulação do aumento da ansiedade induzida em camundongos pelo modelo de TEPT. Para isso utilizaremos camundongos machos da linhagem Suíço que serão submetidos ao protocolo para indução do TEPT, conforme segue: diferentes grupos de camundongos passarão por condicionamento aversivo com choque nas patas na caixa claro-escuro no 1º dia do experimento com situações lembrança nos 7º, 14º e 21º dias do experimento, onde os camundongos serão reexpostos ao lado claro da caixa claro-escuro. Para os Experimentos 1, 2 e 3, no ao 28º dia os animais serão expostos ao labirinto de cruz elevado após aplicação de CoCl₂ ou salina na ínsula, CPF ou córtex cingulado anterior, e, ao 34º dia, serão reexpostos à caixa claro-escuro após aplicação das mesmas substâncias. Nos experimentos 4, 5, 6 ao 28º dia os animais serão expostos ao labirinto de cruz elevado após aplicação de midazolam ou salina na nas estruturas descritas acima. No 34º dia, após aplicação de midazolam, conforme descrito acima, serão reexpostos à caixa claro-escuro. Desse modo, buscaremos aprofundar nosso conhecimento sobre a participação dessas estruturas do sistema nervoso central na modulação das respostas comportamentais de ansiedade associados ao TEPT.

Local do experimento: Laboratório de Psicologia da Aprendizagem

São Carlos, 23 de abril de 2018

A handwritten signature in blue ink, reading 'Luciana Thie Seki Dias'.

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

A handwritten signature in black ink, reading 'Cleoni dos Santos Carvalho'.

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Rosa, L.A. (2024). *Avaliação do papel do córtex orbitofrontal, ínsula e córtex cingulado anterior na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de transtorno de estresse pós-traumático em camundongos*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 106pp.

Resumo

O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é uma condição psiquiátrica que resulta a partir da exposição a eventos traumáticos severos, tendo, como principais sintomas: memórias intrusivas relacionadas ao trauma, esquiva constante, pesadelos, hipervigilância e desamparo emocional. Um dos principais processos cognitivos e comportamentais relacionados ao TEPT é a dificuldade de extinguir a memória traumática, podendo persistir por anos ou por toda vida. Dentre as várias regiões neurais relacionadas com o TEPT, destacamos a importância do córtex pré-frontal, responsável tanto pela codificação como pela regulação de respostas aversivas, o córtex cingulado anterior (CCA), o córtex orbitofrontal (COF) e a ínsula. Para avaliarmos o papel destas regiões na modulação dos comportamentos do tipo ansiedade, utilizamos camundongos machos da linhagem Suíço que foram submetidos ao protocolo para indução do TEPT como segue: no 1º dia do experimento, diferentes grupos de camundongos passaram por exposição única ao choque nas patas (0,5 mA, 10s, condicionamento aversivo) ou sem choque, no lado escuro (LE) da caixa claro-escuro (CCE), e situações de lembrança nos 7º, 14º e 21º dias do experimento, com reexposição dos camundongos ao lado claro (LC) da CCE. No 24º dia, todos os animais passaram por cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia direcionadas as estruturas alvo, CCA, COF e ínsula. No 29º dia os camundongos receberam injeções intra-CCA, intra-COF e intra-ínsula de cloreto de cobalto (CoCl₂) (bloqueador sináptico reversível e não seletivo, na dose de 1 mM/0,1 µL) ou salina (Experimentos 1, 3 e 5), ou midazolam (agonista GABA_A-Benzodiazepínico, nas doses 3,0 e 30,0 nmol/0,1 µL) ou salina (Experimentos 2, 4, 6), e em seguida, foram expostos ao labirinto de cruz elevado (LCE). No 34º dia os camundongos passaram pelo mesmo protocolo de injeções intra-CCA, intra-COF e intra-ínsula, e foram reexpostos à CCE. Os resultados demonstraram que a aplicação de CoCl₂ no CCA, COF e ínsula produziu aumento significativo das porcentagens do número de entradas e do tempo gasto nos braços abertos do LCE, além de aumentar o número de entradas e tempo gasto no lado escuro da CCE. O midazolam intra-CCA não alterou os comportamentos no labirinto, mas aumentou a exploração do LE, durante a reexposição

à CCE. Injeções de midazolam intra-COF, aumentaram a exploração dos braços abertos no LCE, mas diminuíram a exploração do LE da CCE. Entretanto, o midazolam intra-ínsula aumentou tanto a exploração dos braços abertos do LCE quanto a exploração do LE da CCE no teste de reexposição. Em conjunto nossos resultados mostram que: i) a inativação do CCA, COF e ínsula com cloreto de cobalto, induziu comportamento do tipo ansiolítico no LCE e CCE, sugerindo que essas três estruturas são áreas que participam da modulação do comportamento do tipo ansiedade em camundongos. ii) a neurotransmissão GABAérgica do COF e da Ínsula participam do controle emocional associado a resposta aversiva investigada. Entretanto, a ausência de efeito no CCA, sugere que outras neurotransmissões, além da GABAérgica, estejam envolvidas na modulação desses comportamentos.

Palavras-chaves: Transtorno do estresse pós-traumático, Ansiedade, Memória, Córtex cingulado anterior, Córtex orbitofrontal, Ínsula, Camundongos.

Rosa, L.A. (2024). *The role of the orbitofrontal cortex, insula, and anterior cingulate cortex in modulating anxiety induced by the post-traumatic stress disorder model in mice*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 106pp.

Abstract

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatric condition that results from exposure to severe traumatic events, with some of the main symptoms being: intrusive memories related to the trauma, constant avoidance, nightmares, hypervigilance and emotional helplessness. One of the main cognitive and behavioral processes related to PTSD is the difficulty in extinguishing the traumatic memory, which can persist for years or a lifetime. Among the various neural regions related to PTSD, we highlight the importance of the prefrontal cortex, responsible for both the coding and regulation of aversive responses, such as the anterior cingulate cortex (ACC), orbitofrontal cortex (OFC) and the insula. To evaluate the role of these regions in modulating anxiety-type behaviors, we used male mice from the Swiss lineage that were subjected to a protocol for inducing PTSD based on a single exposure to foot shock (0.5 mA, 10s) in the dark side of the Dark-Light Box (DLB) followed by memory situations weekly in the light side of the DLB. To evaluate the modulation of aversive behavior, we performed injections of cobalt chloride (CoCl₂), midazolam (GABA_A-Benzodiazepine agonist, at doses 3.0 and 30.0 nmol) or saline intra-CCA, intra-COF and insula in animals that, then, they were exposed to the elevated plus maze (EPM), and subsequently re-exposed to DLB. Our data demonstrated that application of CoCl₂ to both the CCA, OFC and insula significantly increased the number of entries and time spent in the open arms of the DLB, in addition to increasing the number of entries and time spent on the dark side of the DLB. In contrast, the application of intra-CCA midazolam did not show significant results in the DLB, only during re-exposure to the DLB, increasing the exploration of the dark side. As for the COF, although the application of MDZ increased the exploration of the open arms in the EPM, it decreased the exploration of the dark side of the CCE. In turn, application of MDZ to the insula increased both the exploration of the open arms of the DLB and the exploration of the dark side of the DLB in the reexposure test. The results demonstrated that the application of CoCl₂ to the CCA, OFC and insula produced a significant increase in the percentages of the number of entries and time spent in the open arms of the CSF, in addition to increasing the number of entries and time spent on the dark side of the CSF.

Intra-CCA midazolam did not change behaviors in the maze but increased LE exploration during re-exposure to CCE. Intra-COF midazolam injections increased the exploration of the open arms in the LCE but decreased the exploration of the LE of the CCE. However, intrainsula midazolam increased both the exploration of the open arms of the CSF and the exploration of the LE of the CCE in the reexposure test. Taken together, our results show that: i) inactivation of the CCA, COF and insula with cobalt chloride induced anxiolytic-like behavior in the CSF and CCE, suggesting that these three structures are areas that participate in the modulation of anxiety-like behavior in mice. ii) GABAergic neurotransmission from the OFC and the Insula participates in the emotional control associated with the aversive response investigated. However, the lack of effect on CCA suggests that other neurotransmissions, in addition to GABAergic, are involved in modulating these behaviors.

Keywords: Post-traumatic stress disorder, Anxiety, Memory, Cortex Anterior cingulate, Orbitofrontal cortex, Insula, Mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação do Transtorno de Estresse Pós-traumático

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é uma condição psiquiátrica que se resulta a partir da exposição a eventos traumáticos, como violência interpessoal (como estupro, tentativa de assassinato e agressão física severa), acidentes que põem a vida em risco (como acidentes de trânsito), ou, inclusive, acidentes naturais (como furacões, tsunamis e terremotos) (Yehuda, 2002; American Psychiatric Association, 2013; Yehuda et al., 2015). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V (DSM V) (American Psychiatric Association, 2013), pessoas com TEPT costumam experimentar memórias intrusivas e angustiantes relacionadas ao trauma, pesadelos, hipervigilância, irritabilidade, dificuldades para dormir e desamparo emocional. De fato, a ocorrência de memórias intrusivas, por serem estados dissociativos, é o principal motivo pelo qual o TEPT deixou de ser classificado como um transtorno de ansiedade e passou a ter uma classificação própria no grupo de Transtornos Relacionados ao Trauma e Estresse (American Psychiatric Association, 2013; Yehuda, 2015).

Devido tanto à experiência traumática quanto ao estresse causado pelos próprios sintomas consequentes, pacientes com TEPT tendem a desenvolver outras comorbidades psiquiátricas que intensificam ainda mais o quadro clínico, como abuso de substâncias, transtornos de humor e ansiedade, e comportamento impulsivo e perigoso, o que pode decorrer em automutilação em alguns casos (Kessler & Wang, 2008).

A Tabela 1 sumariza os principais critérios diagnósticos do TEPT de acordo com o DSM V. De qualquer forma, cabe ressaltar que, além das atualizações clínicas quanto à classificação do TEPT, a visão científica e empírica sobre esse transtorno também tem sofrido modificações no decorrer dos anos. Os primeiros estudos sobre esse tema focaram quase que exclusivamente nos mecanismos da memória aversiva de longo prazo devido

a relação entre TEPT e trauma (Yehuda & LeDoux, 2007). Isso foi inclusive fortalecido pelo fato de que os circuitos subcorticais de processamento aversivo, como a ativação amigdalár e regulação endócrina hipotalâmica, permanecem majoritariamente intactos entre as várias espécies (Yehuda et al., 2015).

Tabela 1. Principais critérios diagnósticos do TEPT de acordo com o DSM V (APA, 2013; Yehuda et al., 2015).

Descrição dos critérios	Exemplos específicos	Requerimentos clínicos
Exposição ao estressor	<ul style="list-style-type: none"> - Exposição direta - Testemunhar trauma - Aprender sobre trauma - Exposições frequentes a situações aversivas 	A exposição ao trauma deve ocorrer de forma direta ou indireta
Sintomas intrusivos	<ul style="list-style-type: none"> - Memórias aversivas recorrentes - Pesadelos relacionados ao trauma - Reações intrusivas (<i>flashbacks</i>) - Estresse psicológico frente a situações ou estímulos lembram o trauma - Reações fisiológicas marcantes frente a estímulos que lembram o trauma 	Ao menos um desses exemplos é necessário
Evasão persistente	<ul style="list-style-type: none"> - Pensamentos e emoções relacionados ao trauma - Estímulos externos relacionados ao trauma, como pessoas, lugares ou atividades 	Ao menos um desses exemplos é necessário
Alterações negativas na cognição e humor	<ul style="list-style-type: none"> - Amnésia dissociativa - Crenças e expectativas persistentemente negativas - Culpar a si mesmo ou outro persistentemente 	Ao menos dois desses exemplos são necessários

	<p>pelo trauma de forma distorcida</p> <ul style="list-style-type: none"> - Emoções negativas persistentes: medo, culpa, vergonha, raiva - Diminuição do interesse por atividade em geral - Desapego ou afastamento de outras pessoas - Inabilidade de experienciar emoções positivas 	
Alterações na excitabilidade e reatividade	<ul style="list-style-type: none"> - Comportamento irritável e agressivo - Comportamento autodestrutivo e imprudente - Hipervigilância - Sobressaltos exagerados - Problemas de concentração - Distúrbios do sono 	Ao menos dois desses exemplos são necessários

1.2.Epidemiologia

1.2.1. Militares

Como se sabe, estudos sobre a até então chamada “neurose traumática” datam desde Charcot (1825-1893). Breuer e Freud (1893/1977), por exemplo, teorizaram que a neurose traumática estava associada com dissociações causadas pelo trauma, estabelecendo uma relação entre memórias esquecidas (reprimidas) e etiologia da neurose. De qualquer forma, esse tipo de distúrbio psicológico só ficou mais popular com o estudo de militares da Primeira Guerra Mundial, onde começou a ser analisado sintomas psicóticos devido à exposição ao choque, o que foi denominado “*shell shock*” (trauma pós-guerra) a partir dos trabalhos de Myers (1915). Mas foi com veteranos americanos da Guerra do Vietnã que os estudos sobre trauma realmente dominaram os saguões da

psiquiatria da época, de modo que, em 1980 o termo “transtorno do estresse pós-traumático” apareceu pela primeira no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais III, e, desde então, veteranos de guerra tem sido a principal fonte de participantes nos estudos sobre TEPT (Crocq & Crocq, 2000).

As primeiras avaliações epidemiológicas nos veteranos após a Guerra do Vietnã observaram que a prevalência vitalícia nesse grupo chegava à 28%, e, em 2015, novas avaliações mostraram que 11% dos veteranos do Vietnã continuam com TEPT (Marmar et al., 2015). Já avaliações meta-analíticas sobre dados com veteranos de vários países que foram expostos às guerras do Iraque e Afeganistão, mostraram que a prevalência de TEPT nessa população chegava à 6% nos grupos de apoio (não-expostos diretamente ao combate) e 13% nos grupos expostos ao combate (Kok, Herrell, Thomas & Hoge, 2012). De qualquer forma, avaliações integrativas têm sugerido que, independentemente no nível de exposição ao combate, a prevalência de TEPT atinge o pico de 25 – 30%, demonstrando que há um possível limiar entre sujeição e resiliência (Dohrenwend et al., 2006).

1.2.2. População geral (civis)

Avaliações recentes sobre a prevalência de TEPT têm contabilizado tanto quantas pessoas foram expostas a traumas quanto quantas dessas pessoas vieram realmente a desenvolver TEPT. Surpreendentemente, tem sido constatado que uma parcela considerável da população foi exposta a experiências traumáticas, mas sem desenvolver TEPT. Por exemplo, Kessler, Sonnega, Bromet, Hughes e Nelson (1995) observaram que 70% das mulheres americanas entrevistadas tinham sido expostas a experiências traumáticas, mesmo a prevalência vitalícia de TEPT sendo 7,8%.

Mais recentemente, Karam et al. (2014) mostraram que a prevalência vitalícia de TEPT em diferentes países flutua entre 0,2 - 3,8%, demonstrando que condições sociais e ocupacionais influenciam esses dados. Além disso, assim como no caso de militares, em pessoas expostas a fortes experiências traumáticas, como estupro, a prevalência de TEPT chega a 25 – 50%.

1.3.Memória e Transtorno de Estresse Pós-Traumático

Como descrito acima, pessoas com TEPT continuam experienciando sintomas patológicos com base em memória extremamente aversivas (traumáticas) que ocorreram décadas atrás. Dessa forma, os principais processos mnemônicos relacionados ao TEPT são: memórias aversivas de longo-prazo, memórias intrusivas e dificuldade de extinção.

Memórias aversivas de longo-prazo se baseiam no mesmo mecanismo de armazenamento descrito acima, sendo mantidas através de um processo de plasticidade chamado de potenciação de longo-prazo (LTP), caracterizada por um aumento persistente da força sináptica (estimulação de alta frequência em uma sinapse química) (Bear, Connors & Paradiso, 2007). O que muda é característica afetiva da informação, ou seja, onde e com que nível de atividade ela está sendo representada. Por exemplo, a amígdala tem sido correlacionada com reações afetivas de valência negativa e excitabilidade alta, como emoções do espectro de medo, ansiedade (Shin & Liberzon, 2010; Dunsmoor & Paz, 2015) e dor (Neugebauer, 2015), de modo que memórias de longo-prazo associadas a essas emoções têm também sido correlacionadas com a ativação dessa estrutura (Shin & Liberzon, 2010; Dunsmoor & Paz, 2015; McCarberg & Peppin, 2019). Ou seja, nestes casos, tais memórias aversivas estão relacionadas com processos de LTP na amígdala (Sah & Lüthi, 2008).

Esse processo de consolidação da memória, no caso, memória aversiva de longo-prazo nos pacientes com TEPT é particularmente caracterizado por desregulações em determinadas áreas envolvidas nos processos de representação mnemônica e emocional, como no hipocampo, o que dificulta a consolidação de novas relações mnemônicas, impedindo a extinção (Milad et al., 2009), e desregulações nas áreas pré-frontais, dificultando regulação emocional, o que possibilita a ocorrência de memórias intrusivas (flashbacks) (Clark, Holmes, Woolrich & Mackay, 2016).

Como veremos abaixo, pessoas com TEPT continuam respondendo de forma similar diante de estímulos aversivos mesmo após passarem por extinção (Milad et al., 2009). Isso decorre de um outro processo que está relacionado com patologias do espectro de estresse, medo e/ou ansiedade, como o TEPT: viés atencional a estímulos aversivos do ambiente (Iacoviello et al., 2014; Swick & Ashley, 2017). Esse viés atencional, por sua vez, aumenta a força sináptica dos neurônios envolvidos na representação de estímulos aversivos em detrimento de não-aversivos, contribuindo para a formação de memórias de longo-prazo relacionadas a tais estímulos (Blaut, Paulewicz, Szastok, Prochwicz & Koster, 2013). Além disso, esse enfoque cognitivo a estímulos aversivos propicia que suas características negativas sejam generalizadas para outros estímulos em pessoas com tendência a sentirem ansiedade (Baker et al., 2019), o que é chamado de sobregeneralização do medo, sendo uma das características principais do TEPT (Kaczurkin et al., 2017).

1.4. Correlatos neurais e cognitivos do TEPT

Como podemos observar na importante revisão de Bremner (1999), um dos primeiros correlatos neurais a serem observados em pacientes com TEPT foi o déficit nos processamentos hipocampais, estando pareado com danos na memória verbal e testes

neuropsicológicos. De fato, Gilbertson et al. (2002), através de um estudo realizado com gêmeos univitelinos, observaram que pares de gêmeos com TEPT, tanto os membros expostos quanto os não-expostos à trauma, tinham redução significativa no volume hipocampal em comparação a pares sem TEPT. Posteriormente, Milad et al. (2009) atestaram que hipoatividade hipocampal está provavelmente associada com perdas na aprendizagem da extinção. Nesse experimento, os pesquisadores observaram que pacientes com TEPT mantiveram o mesmo nível de resposta galvânica frente a estímulos que passaram por extinção no dia anterior, o que foi pareado com hipoatividade no hipocampo e no córtex cingulado anterior rostral em contrapartida de hiperativação da amígdala e ínsula. Demonstrando, dessa forma, que déficits hipocampais em pacientes com TEPT não está apenas associado com processos mnemônicos gerais, mas sim com o aprendizado da extinção, dificultando que o indivíduo consiga estabelecer outros pareamentos em relação a estímulos aversivos. Déficits hipocampais similares foram inclusive propostos em roedores a partir de um modelo de TEPT por exposição ao predador, onde ratos mais suscetíveis aos efeitos de longo-prazo da exposição aversiva demonstraram déficits em tarefas de reconhecimento de objeto (Goswami, Samuel, Rodríguez Sierra, Cascardi & Paré, 2012).

De fato, inúmeros trabalhos começaram a fortalecer a participação de outras importantes áreas neurais no TEPT para além do hipocampo, como a amígdala, o córtex pré-frontal medial, o giro do cíngulo e a ínsula, tanto através de pesquisas com humanos quanto com animais não-humanos (Shin, Rauch & Pitman, 2006; Shin & Liberzon, 2010; Pitman et al., 2012). Os autores citados acima têm proposto, por exemplo, que o TEPT está relacionado com o aumento da atividade amigdalal e insular devido a déficits no padrão regulatório do córtex pré-frontal, tanto em humanos (Shin, Rauch & Pitman, 2006; Milad et al., 2009; Yehuda et al., 2015) quanto em roedores (VanElzakker, Dahlgren,

Davis, Dubois & Shin, 2014; Giustino & Maren, 2015). De qualquer forma, o mais importante sobre os padrões de ativação dessas áreas é entender como isso influencia os estados cognitivos e emocionais em pacientes com TEPT.

No geral, pessoas com TEPT flutuam entre dois estados cognitivo-emocionais: hiper-excitabilidade aversiva (por exemplo, atenção demasiada a potenciais estímulos aversivos do ambiente) e hipoexcitabilidade emocional (por exemplo, dificuldade de experienciar emocionais positivas), sendo que cada estado possui padrões de ativação opostos (Lanius et al., 2010). O padrão de hiperexcitabilidade geralmente ocorre quando o paciente reexperiencia o trauma através de estímulos ambientais que podem induzir relembração ou flashbacks. Este estado é caracterizado por uma submodulação emocional decorrente de déficits nos padrões regulatórios do córtex pré-frontal. Durante esses eventos, ocorre hiperativações da amígdala, ínsula e córtex cingulado em decorrência de hipoativações do córtex pré-frontal medial e córtex cingulado rostral (Milad et al., 2009; Pitman et al., 2012; Yehuda et al., 2015), ou seja, é algo que ocorre devido à perda no controle cognitivo, que é majoritariamente executado pelo córtex pré-frontal (Bishop, 2007). Já o padrão de hipoexcitabilidade ocorre quando essas pessoas experienciam despersonalização, desrealização e entorpecimento emocional (Lanius et al., 2010). Durante esse estado ocorre processos de sobrerregulação emocional, caracterizado, ao contrário da hiperexcitabilidade, por uma sobreativação do córtex pré-frontal e córtex cingulado rostral (Yehuda et al., 2015). No geral, é possível que essa flutuação entre diferentes estados cognitivo-emocionais decorra do fato de que pacientes com TEPT reagem ao estresse causado pela hiperexcitabilidade com constante esquiva e desapego.

Cabe aqui ressaltar que há registros de outras áreas neurais que podem estar direta ou indiretamente relacionadas com o TEPT, como o córtex orbitofrontal, já que, além do fato dessa área estar envolvida em processos de extinção do medo e obsessões (Milad &

Rauch, 2007), estudos apontaram que pessoas com TEPT, tanto decorrentes de trauma por câncer (Hakamata et al., 2007) quanto por abuso infantil (Thomaes et al., 2010), possuíam volume reduzido do córtex orbitofrontal (COF). De qualquer forma, estudo sobre a participação do COF no TEPT continuam escassos.

Aqui também cabe destacar que outra região que tem sido bastante discutida quanto ao seu real papel no processamento de informação relacionadas à construção emocional: a ínsula. Atualmente, tem sido proposto que a ínsula está relacionada com predições interoceptivas ao invés de estar diretamente associada com processamento emocional em si (Craig, 2009; Barrett & Simmons, 2015; Quigley et al., 2021; Fermin et al., 2022, 2023). Tanto que foi demonstrado que, mesmo diante de lesão bilateral da ínsula, ainda persiste o processamento emocional e sensação de “eu” (*self*) em humanos (Damasio, Damasio & Tranel, 2013). Também é relevante ressaltar que o processo interoceptivo tem sido associado com interrupção de aprendizagem aversiva (dificuldade na retenção de extinção) em pacientes com TEPT (Joshi, Aupperle & Khalsa, 2023). Inclusive, a ínsula tem sido associada com a reexperiência de eventos aversivos em humanos (Leroy et al., 2022) e comportamento do tipo ansiedade em camundongos expostos a um modelo de TEPT baseado em estresse por contenção (Park, Cho & Huh, 2022).

Dessa forma, no presente estudo, buscamos analisar o papel do córtex cingulado anterior, córtex orbitofrontal e ínsula de camundongos na modulação de comportamentos ligados à ansiedade e memória aversiva de longo prazo com o objetivo de ajudarmos a responder questionamentos sobre o papel de áreas corticais na modulação de processos emocionais (Barrett, 2017; LeDoux & Brown, 2017), e analisar se em roedores (camundongos) as mesmas áreas estão envolvidas na modulação dos comportamentos associados à ansiedade e memória aversiva, assim como evidenciado em humanos.

Considerando as neurotransmissões envolvidas no TEPT, Geuze et al. (2008) observaram que pacientes com TEPT apresentam menor afinidade do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico) se ligar ao seu próprio receptor GABA_A em estruturas como, o córtex, hipocampo e hipotálamo, quando comparados aos pacientes sem TEPT. Desta forma estes resultados sugerem que nos pacientes com TEPT a neurotransmissão GABAérgica está prejudicada. Indo na mesma direção, estudo de neuroimagem (tomografia computadorizada por emissão de pósitrons) mostrou redução do transportador de serotonina (5-HTT) na amígdala de pacientes com TEPT, sugerindo que a desregulação do 5-HTT da amígdala possa aumentar a vulnerabilidade para desenvolvimento do TEPT ou ser consequência da exposição ao trauma (Murrough et al., 2011). Em contrapartida, Neumeister et al. (2013) mostraram que pacientes com TEPT possuíam um número significativamente maior de receptores CB1 em inúmeras áreas encefálicas, principalmente no globo pálido, córtex orbitofrontal, córtex cingulado anterior, amígdala e hipocampo.

1.5. Modelos Animais

Assim como qualquer processo psicológico e/ou psiquiátrico, modelos animais de TEPT têm sido amplamente utilizados para tentar desvendar partes de sua etiologia e mecanismos neurobiológicos (Richter-Levin, Stork & Schmidt, 2018). Para tanto, tem-se usado inúmeros modelos de estresse que tentam capturar diferentes processos que podem estar envolvidos no TEPT, utilizando, para isso, estressores físicos e/ou sociais/psicológicos (Flandreau & Toth, 2018). Para ilustrar, iremos abordar alguns dos principais modelos aqui.

1.5.1. Estressores Psicológicos

Os principais teste de estresse psicológicos nos modelos animais de TEPT são o teste de derrota social e teste exposição ao predador. O teste de derrota social consiste em colocar um roedor (intruso) na caixa de um coespecífico agressivo (residente) (Golden, Covington, Berton & Russo, 2011). Intrusos que passaram por 5-10 min de derrota social (física) seguido reexposição sensorial (não-física) ao residente demonstraram diminuição da interação e exploração social, anedonia, perda de peso e aumento dos comportamentos do tipo ansiedade, inclusive a longo prazo (Pulliam, Dawaghreh, Alema-Mensah & Plotsky, 2010; Golden, Covington, Berton & Russo, 2011).

Por sua vez, no teste exposição ao predador, os roedores são expostos aos seus predadores naturais ou seus respectivos odores, porém, diferentemente do teste de derrota social, na exposição ao predador, sem contato ou violência física direta, apenas apresentação sensorial (Flandreau & Toth, 2018). Uma única exposição ao predador pode eliciar aumento na esquia de novos predadores (generalização aversiva) (Toth et al., 2016), deficiências cognitivas e comportamento do tipo humor negativo no labirinto aquático de Morris (Diamond et al., 2006) e aumenta a hiperexcitação e a hipervigilância no teste de sobressalto (Adamec, Fougere & Risbrough, 2010).

1.5.2. Estressores Físicos

Os principais modelos de estresse físicos utilizados para o TEPT são o estresse de contenção, fixação subaquática (*underwater holding*) e choque elétrico (Flandreau & Toth, 2018). O teste de estresse de contenção, como o próprio nome sugere, se caracteriza por imobilizar o animal por um determinado período. Foi observado que esse estresse aumenta os comportamentos do tipo ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE) (Andero et al., 2013; Carneiro-de-Oliveira et al., 2017), comportamentos compulsivos no

teste de enterrar bolinhas (Kedia & Chattarji, 2014), e déficits na performance no teste de labirinto aquático (Andero et al., 2013). Além disso, estresse de contenção associado com situações de lembrança semanais resultaram em significativa hipoativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal durante 1 hora após a reexposição, sugerindo, segundo os autores, que um estressor grave anterior evocou uma resposta serotoninérgica mal-adaptativa a um estressor subsequente que também se correlacionou com uma resposta do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) significativamente atenuada (Harvey, Brand, Jeeva & Stein, 2006).

Já o estresse de fixação subaquática tenta simular uma espécie de trauma subaquático, onde o animal é inicialmente submetido ao nado forçado e, em seguida, à submersão forçada (Richter-Levin, 1998). Roedores expostos a este teste, demonstram aumento dos comportamentos no tipo ansiedade no LCE até 30 dias após a submersão (Richter-Levin, 1998; Cohen et al., 2004; Moore, Gauchan & Genovese, 2012), além de atividade límbica alterada no mesmo período (Ritov, Boltyansky & Richter-Levin, 2016).

Dentre os testes físicos, o teste mais utilizado no TEPT é o condicionamento aversivo por choque incontrolável e inescapável nas patas (Flandreau & Toth, 2018; Bourin & Hascoët, 2003). Com o objetivo de simular melhor os aspectos mnemônicos do TEPT, as consequências comportamentais destes condicionamentos aversivos tendem a ser testadas a longo prazo, entre 3 e 5 semanas após o condicionamento, geralmente contendo situações de lembrança semanais (Pynoos et al., 1996; Blanco, Souza & Canto-de-Souza, 2017). Roedores expostos a este teste demonstraram tanto comportamentos do tipo ansiedade semanas após condicionamento no LCE e campo aberto quanto esquiva de longo prazo na caixa claro-escuro (Pynoos et al., 1996; Blanco, Souza & Canto-de-Souza, 2017; Careaga, Girardi & Suchecki, 2019).

De modo geral, diferentes modelos e experimentos têm sugerido que uma única exposição é o suficiente para que roedores demonstrem comportamentos aversivos de longo prazo.

Diante das evidências da literatura descritas acima, nós hipotetizamos que: a) a inibição do CCA, COF e Ínsula produz comportamentos do tipo ansiolítico no modelo de TEPT para camundongos; b) a aplicação de midazolam no CCA, COF e Ínsula produz comportamentos do tipo ansiolítico no modelo de TEPT para camundongos.

1.6. Objetivo Geral

Investigar o papel de áreas pré-frontais na modulação do aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

1.6.1. Objetivos Específicos

Para isso, foram realizados os seguintes experimentos:

- 1) Experimento 1. Avaliar se a inibição reversível do córtex cingulado anterior (CCA) com cloreto de cobalto (CoCl₂) modula a ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.
- 2) Experimento 2. Avaliar se a aplicação de midazolam no CCA modula a ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.
- 3) Experimento 3. Avaliar se a inibição reversível do córtex orbitofrontal (COF) com cloreto de cobalto (CoCl₂) modula a ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.
- 4) Experimento 4. Avaliar se a aplicação de midazolam no COF modula a ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

- 5) Experimento 5. Avaliar se a inibição reversível da ínsula com cloreto de cobalto (CoCl₂) modula a ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.
- 6) Experimento 6. Avaliar se a aplicação de midazolam na ínsula modula a ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Sujeitos

Foram utilizados 247 camundongos machos da cepa Suíço-albino entre 3 e 4 semanas de vida (no dia do condicionamento) provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais, durante o período de testes, ficaram alojados no biotério setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA), agrupados em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C), luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acessas às 7:00 horas) e livre acesso à comida e água, exceto durante as sessões de teste. O projeto foi devidamente avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSCar, registrado sob o código 3047280318.

2.2. Drogas

Foi utilizado cloreto de cobalto (CoCl_2 ; Sigma, St. Louis, Missouri, USA), na dose de 1 mM/0,1 μL (Crestani et al., 2010), dissolvido em salina estéril (0,9% NaCl).

Midazolam (MDZ): (8-Cloro-6-(fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4]maleato de benzodiazepina), PM: 441,8, dissolvido em salina (0,9% NaCl), nas doses de 3,0 e 30 nmol/0,1 μL ; Roche, Brasil (Nunes-de-Souza, et al, 2000; dos Reis & Canto-de-Souza, 2008; Barbalho et al, 2009; Baptista et al, 2009).

2.3. Cirurgia Estereotáxica

Após anestesia com solução de cloridrato de cetamina e xilazina [100 mg/kg e 10 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)], os animais passaram por cirurgia estereotáxica (estereotáxico Insight Instruments, Brasil) para a implantação bilateral intracraniana de cânulas-guia (25-gauge x 7 mm; Insight Equipamentos, Brasil). As cânulas foram fixadas

com cimento acrílico no crânio do animal. As coordenadas estereotáxicas para implantação bilateral de cânulas-guia sobre o córtex cingulado anterior, baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001), foram Anteroposterior (AP) = +1,0 mm, Lateral (L) = ±0,5 mm e Dorsoventral (DV) = -1,2 mm, para o córtex orbitofrontal (COF) foram AP = +2,6 mm, L = ±1,3 mm e DV = -1,0 mm, e da ínsula foram AP = +1.4 mm, L = ±2.75 mm e DV = -2.5 mm (DV), de modo que, em todos os casos, as cânulas ficassem 0,5 mm acima da estrutura-alvo. Para a fixação das cânulas, foi utilizada uma prótese de resina acrílica autopolimerizável e um parafuso de aço inoxidável preso ao crânio. O mandril (33-gauge; Fishtex®, Brasil), removido durante o procedimento de microinjeção, foi inserido dentro de cada cânula-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir possível contaminação. Ao final da cirurgia, os animais receberam injeção do anti-inflamatório e analgésico cetoprofeno (5 mg/kg, i.p.) (Lu et al., 2004), e antibiótico ceftriaxona (4 mg/kg, i.p.) (Stepanovic-Petrovic et al., 2014). Os animais permaneceram em recuperação por 4 a 5 dias após a cirurgia, e posteriormente foram submetidos ao teste comportamental.

2.4. Microinjeção de cloreto de cobalto

Para investigar o papel do CCA, COF e ínsula, foram realizadas inativações não-seletivas e reversíveis bilaterais com CoCl_2 (1 mM/0,1 μL) na estrutura-alvo. Após a aplicação, o CoCl_2 permanece na fenda sináptica por cerca de 15 minutos até ser totalmente metabolizado (por isso, reversível). Durante esse período, os cátions de Cobalto (Co^{2+}), de forma não seletiva, se acoplam nos canais de cálcio, impedindo a entrada dos cátions de Cálcio (Ca^{2+}), inibindo, assim, a liberação de neurotransmissores pelos neurônios atingidos (KRETZ, 1984; RESSTE et al, 2006; RESSTEL et al, 2008; CRESTANI et al., 2010;).

No 29º e 34º dia, 30 minutos antes do início dos experimentos os animais foram transportados do biotério setorial do LPA para a sala de testes. Assim, 5 minutos antes dos testes comportamentais, cada animal foi manual e gentilmente contido pelo experimentador, e a agulha de injeção (33-gauge) foi inserida dentro da cânula-guia para a injeção de 0,1 µL de solução 1mM de CoCl₂ ou salina intra-CCA, intra-COF e intra-ínsula. O comprimento da agulha de injeção ultrapassou 1,3 mm a ponta da cânula-guia.

A agulha de microinjeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), à microseringa Hamilton (10µL). Uma bomba de infusão (Insight BI2000) foi programada para injetar 0,1 µL de solução durante um período de 60 segundos, e após a injeção a agulha permaneceu por mais 90 segundos dentro da cânula, para evitar refluxo da solução injetada. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmou o fluxo da solução (Nunes-de-Souza et al., 2000; Reis & Canto-de-Souza, 2008).

2.5. Microinjeção de midazolam

Para investigar o efeito deste agonista dos receptores GABA_A-benzodiazepínico no CCA, COF e ínsula, foram realizadas injeções de salina ou midazolam (3,0 e 30,0 nmol/0,1µL). Esse fármaco se liga nos alelos γ (benzodiazepínicos) dos receptores GABA_A, abrindo, assim, os canais de cloro, hiperpolarizando o neurônio e inibindo a geração do potencial de ação (Volk et al., 2016; Rang et al., 2012; Davies et al., 2011; Haefely et al., 1990).

O procedimento de injeção foi semelhante ao descrito para a injeção de cloreto de cobalto, descrito acima.

2.6. Equipamentos

2.6.1. Caixa claro escuro (CCE)

A CCE, modificada de Bourin & Hascoët (2003), foi feita de acrílico escuro, medindo 60 x 47 x 29 cm (Insight®, Brasil), formada por um compartimento claro (28 x 47 x 29 cm) e um compartimento escuro (20 x 47 x 29 cm), interligados por uma porta do tipo guilhotina (7 x 7 cm). O assoalho dos compartimentos claro e escuro, era formado por 35 barras de metal, ligadas a um emissor de choque (Insight®, Brasil). No teto do lado claro está fixada uma lâmpada de LED de 275 lux, que podia ser acesa manualmente (Blanco et al., 2017).

Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz (08h30 - 16h00) (Fig. A).

Figura A. Foto da caixa claro-escuro (CCE) utilizada para os experimentados realizados. Ela está localizada no Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) da UFSCar. Foto do próprio autor.



2.6.2. Labirinto em cruz elevado

Consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados transparentes (30 x 5 x 15 cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (Lister, 1987). A iluminação utilizada foi de 77 lux no assoalho da plataforma

central. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz (08h30 - 16h00) (Fig. B).

Figura B. Foto do labirinto em cruz elevado (LCE) utilizado para os experimentos realizados. Ele está localizado no Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) da UFSCar. Foto do próprio autor.



2.7. Histologia

Após o término dos experimentos todos os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina (100/10 mg/Kg, i.p.) e receberam a injeção de 0,1 μ L de uma solução de azul de Evans a 1,5% na estrutura-alvo, de acordo com o procedimento descrito anteriormente para administração central de drogas. Após a injeção, os camundongos foram sacrificados com o auxílio da câmara de CO₂, decapitados e seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Posteriormente, os encéfalos foram seccionados (50 μ m) em criostato a -20°C (Leica CM1850) para análise histológica dos sítios de injeção. As secções foram avaliadas com o auxílio de um microscópio (Olympus BX41TF) e a visualização da dispersão do azul de Evans indicou o local da injeção central de drogas, segundo o atlas de Paxinos e

Franklin (2004). Os camundongos cujas injeções não atingiram a estrutura alvo citada acima foram excluídos do estudo.

2.8. Procedimentos

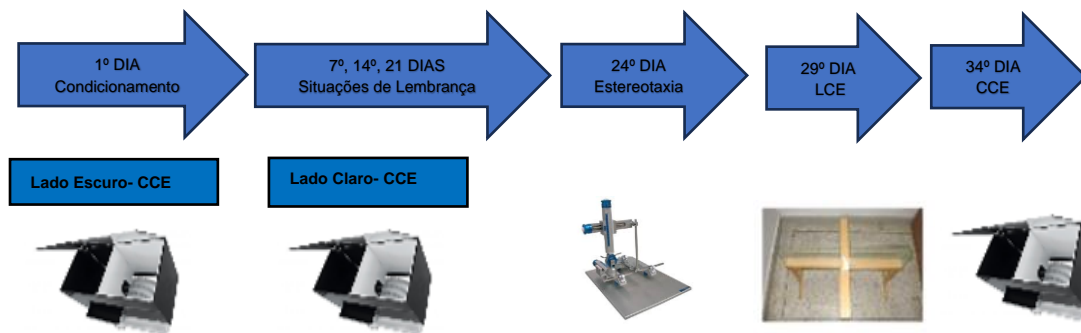
Para estabelecer o modelo de TEPT os camundongos passaram pelo seguinte protocolo experimental (Fig. C):

- Treinamento na caixa claro-escuro (CCE) - No primeiro dia de teste os animais do grupo com choque (CCHO) foram confinados no lado escuro (LE) da caixa e após 2 minutos, a guilhotina foi aberta permitindo a exploração no lado claro (LC) da caixa. Assim que o animal entrou no LC, uma lâmpada de 25W foi acesa, onde foi aguardado o retorno do animal ao LE da caixa. A guilhotina foi novamente fechada e os animais foram expostos ao choque nas patas por 10 segundos (0,5 mA). Após um minuto, os animais foram retirados da CCE, retornando para respectiva gaiola.
- Situações de Lembrança (SL) – No 7º, 14º e 21º dia os grupos foram reexpostos ao LC (Louvard et al., 2005) da caixa CCE por 2 minutos, sem choque, e em seguida retornaram para respectiva gaiola.
- Avaliação no Labirinto em cruz elevado (LCE) – No 29º dia, os grupos foram submetidos ao LCE. A exposição ao LCE consistiu em colocar os camundongos individualmente sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços abertos, onde foi permitido explorar o labirinto por um período de cinco minutos para o registro dos índices de ansiedade [porcentagem do número de entradas (%EBA) e tempo gasto nos braços abertos (%TBA), e o número de entradas nos braços fechados (EBF), como avaliação da atividade locomotora]. Também foram avaliados os comportamentos de stretch-attend posture (SAP)

(caracterizado pelo comportamento de esticar para avaliar informação ambiental enquanto a parte traseira do animal permanece imóvel), Mergulhos (que ocorrem quando o animal inclina sua cabeça abaixo da borda do braço aberto para observar o piso abaixo do labirinto), Levantamentos (que ocorre quando o animal se apoia nas patas traseiras e coloca as patas dianteiras apoiadas sobre uma das paredes do labirinto) e Imobilidade (quando o animal expressa somente os movimentos respiratórios com total ausência de outros movimentos do corpo). Para os experimentos utilizados, as entradas foram reconhecidas quando o animal adentrasse em um dos braços ou centro com as quatro patas. Os braços abertos são considerados áreas desprotegidas, enquanto os braços fechados e o centro, são áreas protegidas do LCE (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

- Avaliação na CCE – No 34º dia os mesmos grupos foram reexpostos à CCE. O teste consistiu em colocar os camundongos individualmente sobre a plataforma do LC, onde foi permitido explorar os dois ambientes da CCE por um período de cinco minutos para registro da latência para entrar no LE da caixa, do número de entradas no LE e do tempo gasto no LE. Para todos os experimentos, as entradas foram reconhecidas quando o animal adentrasse um dos lados com as quatro patas.
- Os animais do grupo sem choque (SCHO) passaram pelos mesmos procedimentos descritos acima para o grupo com choque (CCHO), só que sem aplicação de choque no primeiro dia.

Figura C. Modelo ilustrativo do protocolo experimental descrito acima. Cada camundongo foi submetido a todos esses processos de avaliação comportamental e farmacológica.



2.8.1. Experimento 1. Avaliar se a inibição reversível do córtex cingulado anterior com cloreto de cobalto (CoCl_2) modula o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

Para esse experimento, os camundongos do grupo CCHO ($n = 16/\text{grupo}$) passaram por condicionamento aversivo e situações lembrança na caixa claro-escuro como descrito acima. No 24º dia, ambos os grupos de animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionados ao CCA (Cg2). No 29º dia, os camundongos receberam injeções intra-CCA (Cg2) de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), conforme procedimento descrito acima, e, após 5 minutos, foram submetidos ao LCE. No 34º dia, os camundongos receberam injeções intra-CCA (Cg2) de salina ou CoCl_2 e, após 5 minutos, foram submetidos à CCE. Os animais do grupo SCHO ($n = 11-12/\text{grupo}$) passaram pelo mesmo procedimento sem serem expostos ao choque.

2.8.2. Experimento 2. Avaliar se a aplicação de midazolam no córtex cingulado anterior reverte o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

Utilizamos, nesse experimento, três grupos de camundongos CCHO ($n = 10/\text{grupo}$), onde todos passaram pelo condicionamento aversivo e situações lembrança na caixa claro-escuro. No 24º dia, todos os grupos de animais foram submetidos à cirurgia

estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionados ao CCA (Cg2). No 29º dia, os camundongos receberam injeções de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) no CCA (Cg2), conforme procedimento descrito no Experimento 1, e, após 5 minutos, foram submetidos ao LCE. No 34º dia, os camundongos receberam injeções de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) e, após 5 minutos, foram reexpostos à CCE. Os animais do grupo SCHO (n = 9/grupo) passaram pelo mesmo procedimento sem serem expostos ao choque.

2.8.3. Experimento 3. Avaliar se a inibição reversível do córtex orbitofrontal com cloreto de cobalto (CoCl₂) modula o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

Para esse experimento, dois grupos de camundongos CCHO (n = 10-11/grupo) passaram por condicionamento aversivo e situações lembrança na caixa claro-escuro como descrito acima. No 24º dia, ambos os grupos de animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionados ao COF. No 29º dia, os camundongos receberam injeções intra-COF de salina ou CoCl₂ (1 mM/0,1 µL), conforme procedimento descrito acima, e, após 5 minutos, foram submetidos ao LCE. No 34º dia, os camundongos receberam injeções COF de salina ou CoCl₂ e, após 5 minutos, foram submetidos à CCE. Os animais do grupo SCHO (n = 5-6/grupo) passaram pelo mesmo procedimento sem serem expostos ao choque.

2.8.4. Experimento 4. Avaliar se a aplicação de midazolam no córtex orbitofrontal reverte o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

Utilizamos, nesse experimento, três grupos de camundongos (n = 9-10/grupo), onde todos passaram pelo condicionamento aversivo e situações lembrança na caixa

claro-escuro. No 24º dia, todos os grupos de animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionados ao COF. No 29º dia, os camundongos receberam injeções de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) no COF, conforme procedimento descrito no Experimento 1, e, após 5 minutos, foram submetidos ao LCE. No 34º dia, os camundongos receberam injeções de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) e, após 5 minutos, foram reexpostos à CCE. Os animais do grupo SCHO (n = 5-6/grupo) passaram pelo mesmo procedimento sem serem expostos ao choque.

2.8.5. Experimento 5. Avaliar se a inibição reversível da ínsula com cloreto de cobalto (CoCl₂) modula o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

Para esse experimento, dois grupos de camundongos (n = 8/grupo) passaram por condicionamento aversivo e situações lembrança na caixa claro-escuro como descrito acima. No 24º dia, ambos os grupos de animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionados à ínsula. No 29º dia, os camundongos receberam injeções intra-ínsula de salina ou CoCl₂ (1 mM/0,1 µL), conforme procedimento descrito acima, e, após 5 minutos, foram submetidos ao LCE. No 34º dia, os camundongos receberam injeções intra-ínsula (Cg2) de salina ou CoCl₂ e, após 5 minutos, foram submetidos à CCE. Os animais do grupo SCHO (n = 6-8/grupo) passaram pelo mesmo procedimento sem serem expostos ao choque.

2.8.6. Experimento 6. Avaliar se a aplicação de midazolam na ínsula reverte o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

Utilizamos, nesse experimento, três grupos de camundongos (n = 7-9/grupo), onde todos passaram pelo condicionamento aversivo e situações lembrança na caixa claro-escuro. No 24º dia, todos os grupos de animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia direcionados à ínsula. No 29º dia, os camundongos receberam injeções de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) na ínsula, conforme procedimento descrito no Experimento 1, e, após 5 minutos, foram submetidos ao LCE. No 34º dia, os camundongos receberam injeções de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1µL) e, após 5 minutos, foram reexpostos à CCE. Os animais do grupo SCHO (n = 5-6/grupo) passaram pelo mesmo procedimento sem serem expostos ao choque.

2.9. Análise Estatística

Os dados são apresentados como média ± EPM (erro padrão da média).

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias [fator 1, condição (Experimentos 1- 6: sem choque x com choque), fator 2, tratamento (Experimentos 1, 3 e 5: salina x CoCl₂; Experimentos 2, 4 e 6: salina x midazolam 3,0 e 30 nmol/0,1 ul)].

Os casos de significância foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Em todas as análises, $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Córtex Cingulado Anterior

3.1.1. Resultados da histologia

A análise histológica confirmou que 112 camundongos receberam canulação positiva no CCA (Cg2) (Fig. 1). 55 animais foram utilizados para investigar a modulação da ansiedade e memória aversiva pelo modelo de TEPT para camundongos após administração intra-CCA (Cg2) de salina ou CoCl_2 , [Experimento 1 – CCHO: Salina (n = 16) e CoCl_2 (n = 16); SCHO: Salina (n = 11) e CoCl_2 (n = 12)]. 57 animais foram utilizados para investigar o efeito do midazolam (3,0 e 30 nmol) intra-CCA (Cg2) na modulação da ansiedade e memória aversiva pelo modelo de TEPT para camundongos [Experimento 2 – CCHO: Salina (n = 10), MDZ 3,0 nmol (n = 10) e MDZ 30,0 nmol (n = 10); SCHO: Salina (n = 9), MDZ 3,0 nmol (n = 9) e MDZ 30,0 nmol (n = 9)].

Figura 1A. Representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (2004). Os pontos pretos representam o local de acerto de alguns animais que tiveram canulação positiva, os pontos em cinza representam aqueles canulados fora do CCA.

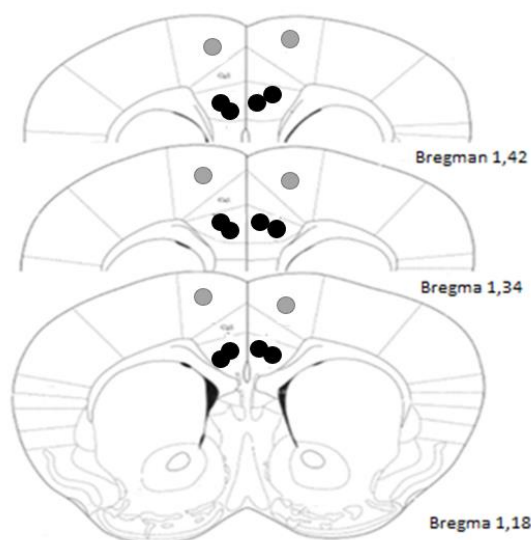
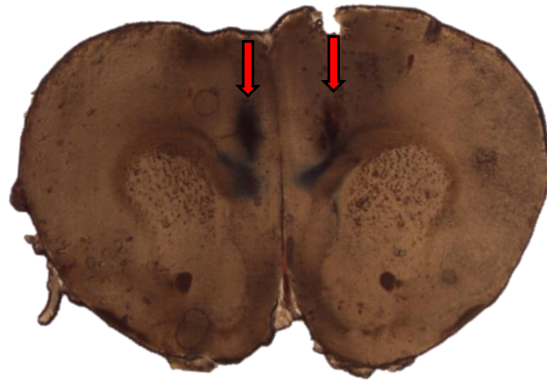


Figura 1B. Fotomicrografia de uma seção coronal de um sujeito representativo, demonstrando os locais de microinjeção intra-CCA, Bregma 1,34mm. (Fonte: próprio autor, 2020).



3.1.2. Experimento 1. Efeito da inibição reversível do córtex cingulado anterior com cloreto de cobalto (CoCl₂) sobre o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos

As Figuras 2 (A, B e C) mostram o efeito do tratamento com salina e CoCl₂ intra-CCA, sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT, com e sem choque.

A ANOVA de dois fatores (fator 1, condição (SCHO ou CCHO); e fator 2, tratamento (substância injetada) – intra-CCA), seguida pelo teste Duncan, demonstrou aumento significativo na porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA) para o tratamento com CoCl₂ intra-CCA nos grupos SCHO e CCHO ($F_{1,51} = 71,02$; $p < 0,05$), sem mostrar efeito para condição ($F_{1,51} = 1,07$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 2,26$; $p > 0,05$) (Fig. 2A).

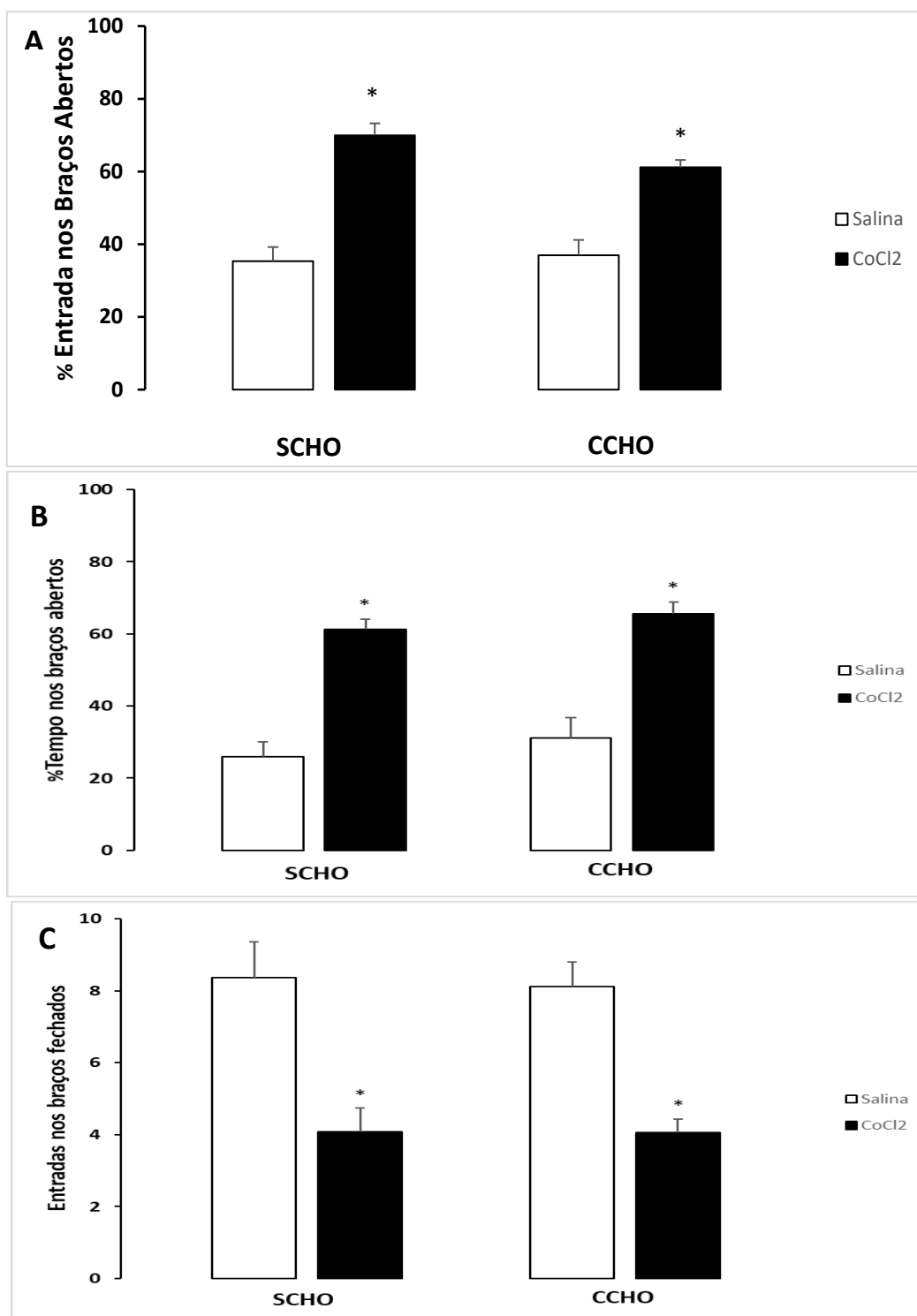
Quanto à porcentagem de entrada nos braços abertos (%EBA), a ANOVA de dois fatores revelou efeitos significativos para o fator tratamento ($F_{1,51} = 66,02$; $p < 0,05$), sem mostrar efeito para condição ($F_{1,51} = 1,27$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 0,007$; $p > 0,05$).

O teste de Duncan revelou aumento significativo na %TBA para os animais dos grupos SCHO e CCHO que receberam tratamento com CoCl_2 intra-CCA comparados aos respectivos grupos tratados com salina (Fig. 2B).

A respeito das entradas nos braços fechados (EBF), a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para o fator tratamento ($F_{1,51} = 38,74$; $p < 0,05$), sem mostrar efeito para condição ($F_{1,51} = 1,03$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 0,02$; $p > 0,05$) (Fig. 2C).

O teste de Duncan revelou diminuição significativa nas entradas nos braços fechados (EBF) para os animais dos grupos SCHO e CCHO que receberam tratamento com CoCl_2 intra-CCA, comparados aos respectivos grupos tratados com salina.

Figura 2. Efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto (CoCl₂) intra-CCA sobre as (A) porcentagens de entradas (%EBA), (B) porcentagens de tempo nos braços abertos (%TBA) e (C) entradas nos braços fechados (EBF), (CCHO n=16-16; SCHO n=11-12). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) da %EBA braços abertos do LCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.



A Tabela 2 mostra o efeito do tratamento com salina e CoCl_2 intra-CCA, sobre os outros comportamentos de camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

Para os comportamentos de avaliação de risco, a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para o fator tratamento [porcentagem de tempo no centro (%TC) ($F_{1,51} = 7,50$; $p < 0,05$), porcentagem de esticar protegido (%SAP) ($F_{1,51} = 40,08$; $p < 0,05$), porcentagem de mergulho protegido ($F_{1,51} = 11,5$; $p < 0,05$)], sem mostrar efeito para condição [porcentagem de tempo no centro (%TC) ($F_{1,51} = 0,75$; $p > 0,05$), porcentagem de esticar protegido (%SAP) ($F_{1,51} = 0,02$; $p > 0,05$), porcentagem de mergulho protegido ($F_{1,51} = 2,19$; $p > 0,05$)], e interação condição e tratamento [porcentagem de tempo no centro (%TC) ($F_{1,51} = 0,03$; $p > 0,05$), porcentagem de esticar protegido (%SAP) ($F_{1,51} = 0,001$; $p > 0,05$), porcentagem de mergulho protegido ($F_{1,51} = 0,04$; $p > 0,05$)].

O teste de Duncan revelou diminuição significativa para %TC [animais do grupo CCHO que receberam tratamento com CoCl_2 intra-CCA, comparados ao grupo salina CCHO], %SAP protegido e porcentagem de mergulho protegido [animais dos grupos SCHO e CCHO que receberam tratamento com CoCl_2 intra-CCA, comparados aos respectivos grupos tratados com salina].

Para o comportamento de exploração vertical (levantamentos), a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeito significativo para o fator condição ($F_{1,51} = 11,16$; $p < 0,05$), sem mostrar efeito para tratamento ($F_{1,51} = 1,43$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 2,55$; $p > 0,05$).

O *post hoc* revelou diminuição significativa para os levantamentos dos animais tratados intra-CCA com salina no grupo CCHO, comparados aos animais SCHO.

A ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou que os comportamentos: total de SAP [condição ($F_{1,51} = 3,33$ $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 0,12$; $p > 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 2,44$; $p > 0,05$)], total de mergulhos [condição ($F_{1,51} = 0,04$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 0,51$; $p > 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 1,98$; $p > 0,05$)] e imobilidade [nulo].

Tabela 2. Efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto (CoCl_2) intra-CCA sobre % Tempo no centro, o total de esticar (SAP), a % SAP protegido, total de mergulhos, % mergulhos protegidos, total de levantamentos e total de imobilidade no LCE em camundongos (CCHO n=16-16; SCHO n=11-12). Os valores representam as médias e o erro padrão da média ($M \pm \text{EPM}$) desses comportamentos avaliados no LCE. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo salina; # $P < 0,05$ comparado ao grupo SCHO e respectivo CoCl_2 (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.

Comportamentos	Sem Choque		Com Choque	
	Salina	CoCl_2	Salina	CoCl_2
%Tempo no Centro	16,1 \pm 1,9	12,0 \pm 1,9	17,8 \pm 1,5	13,1 \pm 1,0*
Total de SAP	24,7 \pm 2,3	22,3 \pm 2,3	18,0 \pm 1,5	21,8 \pm 0,9
%SAP Protegido	77,8 \pm 5,0	44,1 \pm 6,0*	76,7 \pm 6,4	43,4 \pm 2,5*
Total de Mergulhos	33,6 \pm 2,9	35,7 \pm 3,3	38,5 \pm 3,7	32,0 \pm 1,6
%Mergulhos Protegidos	35,3 \pm 7,6	17,0 \pm 4,3*	41,7 \pm 5,7	25,6 \pm 1,5*
Levantamentos	7,1 \pm 1,4	6,8 \pm 0,8	2,8 \pm 0,6#	5,3 \pm 0,6
Imobilidade	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

3.1.3 Efeito do tratamento com salina e CoCl_2 intra-CCA/Cg2, sobre o comportamento de camundongos expostos a CCE, após passarem pelo modelo de TEPT.

A Figura 3 (A, B e C) mostra o efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto intra-CCA sobre o comportamento de camundongos expostos ao teste na CCE após passarem pelo modelo de TEPT.

Quanto à latência da entrada no lado escuro da CCE, a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para os fatores condição

($F_{1,51} = 13,82$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 16,42$; $p < 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 18,17$; $p < 0,05$) (Fig. 3A).

O teste de Duncan revelou aumento significativo na latência para entrada no lado escuro da CCE nos animais CCHO, comparados aos animais SCHO salina. O CoCl_2 intra-CCA diminuiu a latência para entrada no lado escuro da CCE nos animais CCHO, comparados aos animais CCHO salina.

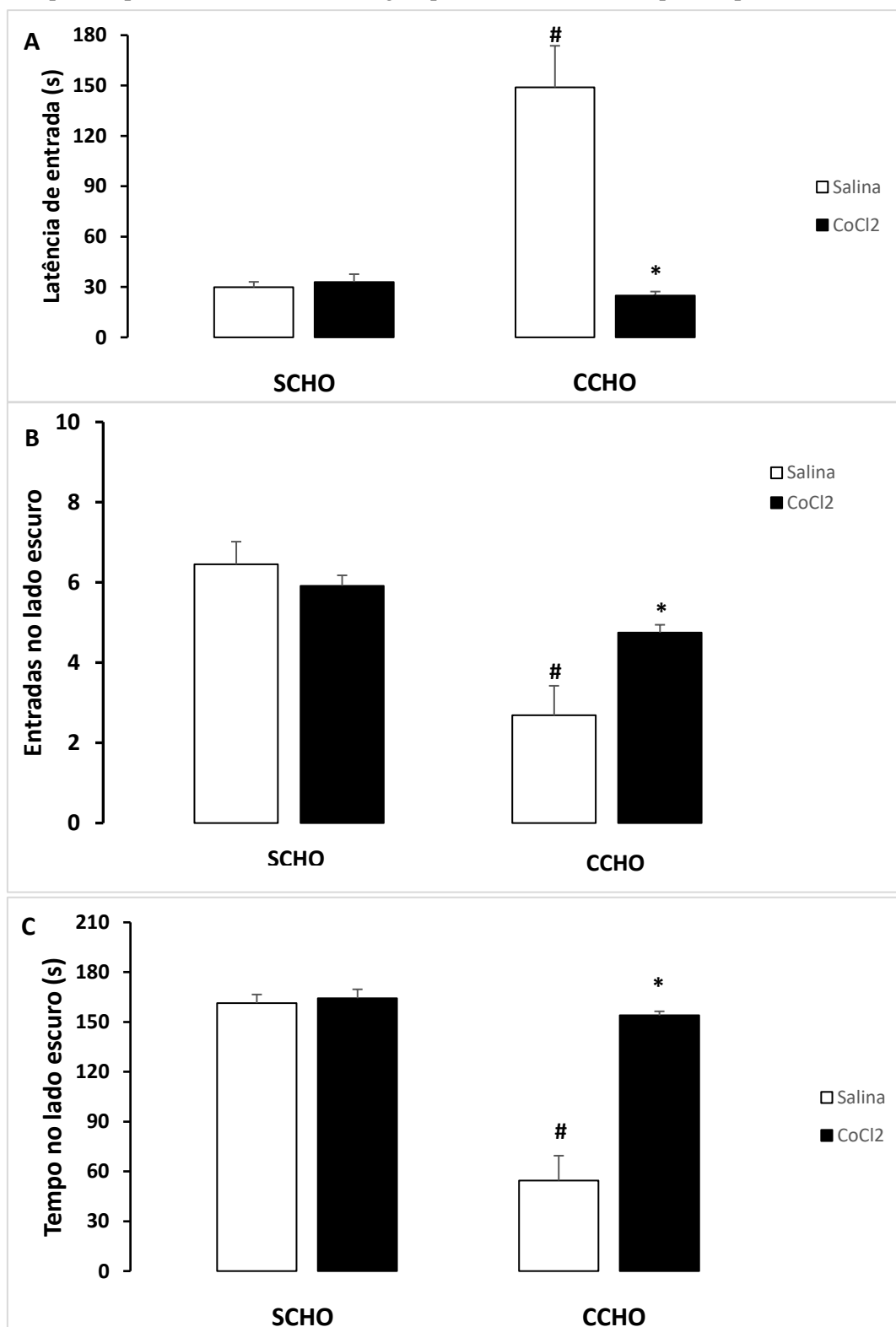
Quanto às entradas no lado escuro (ELE) da CCE, a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para o fator condição ($F_{1,51} = 22,78$; $p < 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 6,32$; $p < 0,05$), sem mostrar efeito para o tratamento ($F_{1,51} = 2,17$; $p > 0,05$) (Fig. 3B).

O teste de Duncan revelou diminuição significativa sobre o número de entradas no lado escuro (ELE) da CCE nos animais CCHO, comparados aos animais SCHO salina. O CoCl_2 intra-CCA aumentou a latência para entrada no lado escuro da CCE nos animais CCHO, comparados aos animais CCHO salina.

A ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para os fatores condição ($F_{1,51} = 37,71$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 28,84$; $p < 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 25,58$; $p < 0,05$) (Fig. 3C).

O teste de Duncan revelou diminuição significativa no tempo gasto no lado escuro da CCE nos animais CCHO, comparados aos animais SCHO salina. O CoCl_2 intra-CCA aumentou o tempo gasto no lado escuro da CCE nos animais CCHO, comparados aos animais CCHO salina.

Figura 3. Efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto (CoCl₂) intra-CCA sobre o a **(A)** latência para a entrada no lado escuro, **(B)** número de entradas no lado escuro (ELE), **(C)** tempo gasto no lado escuro (TLE) da CCE em camundongos (CCHO n=16-16; SCHO n=11-12). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do TLE e a latência para entrada no lado escuro da caixa CCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo salina, #P < 0,05 comparado ao grupo SCHO (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.



3.1.4. Experimento 2. Avaliar se a aplicação de midazolam no córtex cingulado anterior (Cg2) reverte o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

As Figuras 4 (A, B e C) mostram o efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-CCA, sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

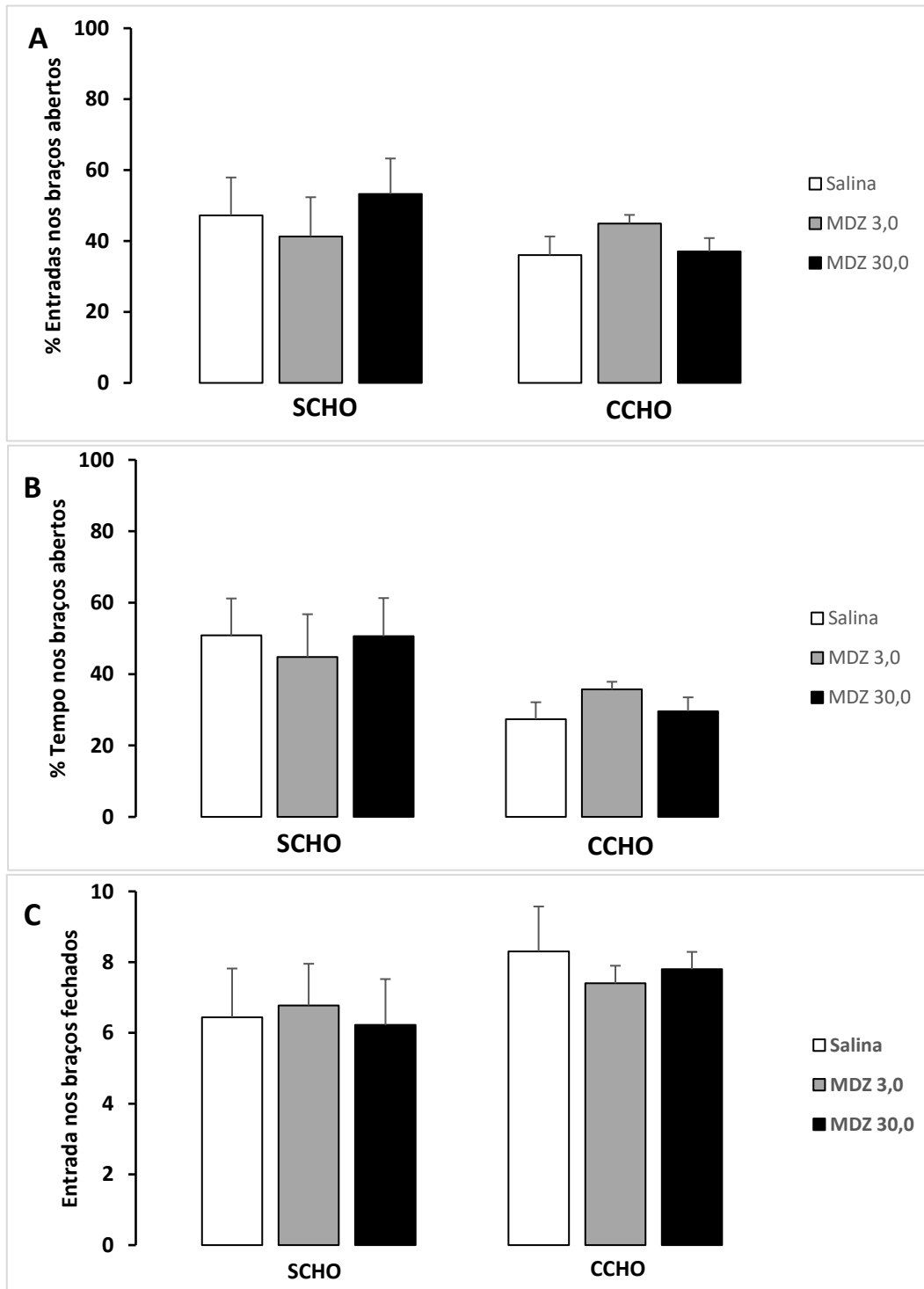
A respeito da %EBA, a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou ausência de efeitos significativos para os fatores condição ($F_{1,51} = 1,61$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 0,10$; $p > 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 0,90$; $p > 0,05$) (Fig. 4A).

Quanto à %TBA, a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeito significativo para o fator condição ($F_{1,51} = 7,65$; $p < 0,05$), e ausência de efeitos significativos para o fator tratamento ($F_{1,51} = 0,01$; $p > 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 0,47$; $p > 0,05$) (Fig. 4B).

Apesar da ANOVA ter revelado efeito para o fator condição, o *post hoc* não confirmou o efeito.

Em relação ao EBF, a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou ausência de efeitos significativos para os fatores condição ($F_{1,51} = 2,41$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 0,06$; $p > 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 0,18$; $p > 0,05$) (Fig. 4C).

Figura 4. Efeito do tratamento com salina e midazolam (MDZ, 3,0 e 30 nmol) intra-CCA sobre as (A) porcentagens de entradas (%EBA), (B) porcentagens de tempo (%TBA), (C) entradas nos braços fechados (EBF) do LCE em camundongos (CCHO n=10 p/grupo; SCHO n=9 p/grupo. As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) das %EBA nos braços abertos do LCE. CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.



A Tabela 3 mostra o efeito do tratamento com salina e midazolam (MDZ, 3,0 e 30 nmol) intra-CC, sobre os outros comportamentos de camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

Para os comportamentos de avaliação de risco, a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para o fator condição [porcentagem de tempo no centro (%TC) ($F_{2,51} = 6,26$; $p < 0,05$), total de SAP ($F_{2,51} = 4,40$; $p < 0,05$), total de mergulhos ($F_{2,51} = 6,70$; $p < 0,05$), %SAP protegido ($F_{2,51} = 4,21$; $p < 0,05$), %mergulho protegido ($F_{2,51} = 9,30$; $p < 0,05$)], sem mostrar efeito para o tratamento [%TC ($F_{2,51} = 1,35$; $p > 0,05$), total de SAP ($F_{2,51} = 0,23$; $p > 0,05$), %SAP protegido ($F_{2,51} = 0,80$; $p > 0,05$), total de mergulhos ($F_{2,51} = 0,13$; $p > 0,05$), %mergulhos protegidos ($F_{2,51} = 0,06$; $p > 0,05$)] e interação condição e tratamento [%TC ($F_{2,51} = 0,39$; $p > 0,05$), total de SAP ($F_{2,51} = 0,11$; $p > 0,05$), %SAP protegido ($F_{2,51} = 0,19$; $p > 0,05$), total de mergulhos ($F_{2,51} = 1,13$; $p > 0,05$), %mergulhos protegidos ($F_{2,51} = 0,58$; $p > 0,05$)].

O teste de Duncan revelou diminuição significativa para %TC [animais do grupo CCHO salina comparados ao grupo SCHO MDZ 3,0], total de mergulhos [animais do grupo SCHO salina em comparação aos animais dos grupos CCHO salina e MDZ 30,0].

E, embora a ANOVA de duas vias tenha mostrado significância no fator condição no total de SAP, %SAP protegido, total de mergulhos e %mergulhos protegidos, o teste Duncan não encontrou diferença entre os grupos.

A ANOVA de duas vias não mostrou diferença no total de levantamentos [condição ($F_{2,51} = 0,51$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{2,51} = 0,54$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,51} = 0,43$; $p > 0,05$)] e imobilidade (nulo).

Comportamentos	Sem Choque			Com Choque		
	Salina	MDZ 3,0	MDZ 30,0	Salina	MDZ 3,0	MDZ 30,0
%Tempo no Centro	13,7±3,7	8,5±1,6	13,4±3,1	18,9±2,3 [#]	15,9±2,2	16,4±1,6
Total de SAP	30,0±4,7	30,8±2,7	31,3±5,0	24,6±2,0	23,5±1,9	27,1±2,6
%SAP Protegido	54,6±11,1	48,0±13,2	48,5±11,2	72,3±5,7	53,3±5,5	66,6±4,0
Total de Mergulhos	44,7±6,0	37,5±7,3	39,3±4,9	28,2±2,5 [#]	34,9±2,4	29,2±3,2 [#]
%Merg. Protegidos	31,9±10,5	37,9±14,1	32,4±11,7	60,9±7,4	49,3±2,1	60,4±5,4
Levantamentos	8,6±2,5	12,5±2,5	11,7±2,3	9,7±1,9	10,1±1,8	9,5±1,4
Imobilidade	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Tabela 3. Efeito do tratamento com salina e midazolam (MDZ) intra-CCA sobre %Tempo no centro, o total de esticar (SAP), a % SAP protegido, total de mergulhos, % mergulhos protegidos, total de levantamentos e total de imobilidade no LCE em camundongos (CCHO n=10 p/grupo; SCHO n=9 p/grupo). Os valores representam as médias e o erro padrão da média (M±EPM) desses comportamentos avaliados no LCE.

3.1.5. Efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-CCA/Cg2, sobre o comportamento de camundongos expostos a CCE, após passarem pelo modelo de TEPT.

A Figuras 5A mostra o efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-CCA, sobre o comportamento de camundongos expostos ao teste na CCE após passarem pelo modelo de TEPT.

A respeito da latência de entrada no lado escuro, a ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para os fatores condição ($F_{1,51} = 25,93$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 6,82$; $p < 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 5,56$; $p < 0,05$) (Fig. 5A).

O teste de Duncan revelou aumento significativo na latência para entrada no lado escuro da CCE nos animais CCHO comparados aos animais SCHO salina e midazolam 3,0 nmol. O tratamento intra-CCA de midazolam 30 nmol diminuiu a latência para entrada no lado escuro da CCE nos animais CCHO comparados aos animais CCHO salina.

A Figura 5B mostra o efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-CCA sobre o ELE da CCE em camundongos expostos ao teste na CCE após passarem pelo modelo de TEPT.

A ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para os fatores condição ($F_{1,51} = 28,34$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 10,77$; $p < 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 5,32$; $p < 0,05$).

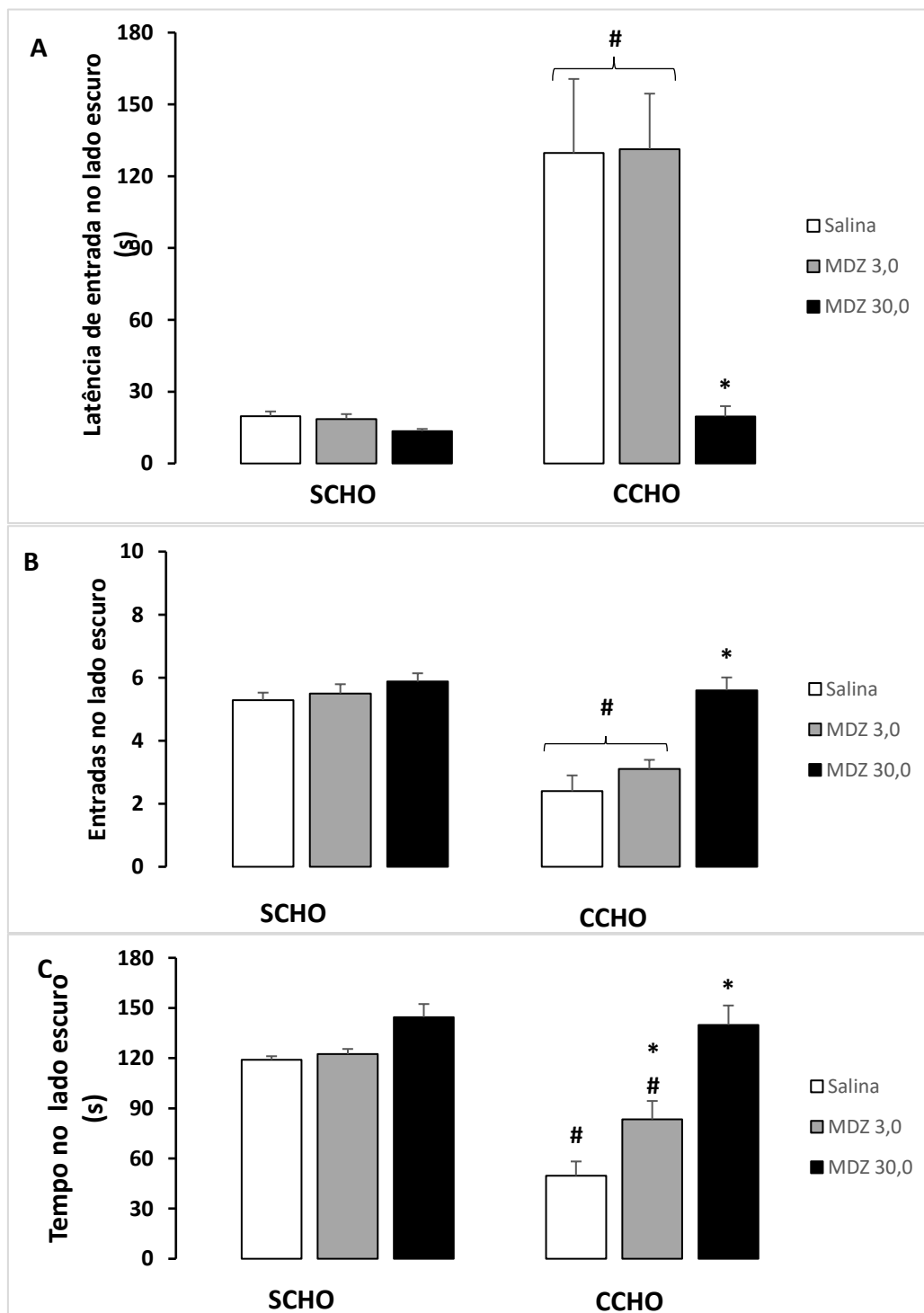
O teste de Duncan revelou diminuição significativa sobre o número de entradas no lado escuro (ELE) da CCE nos animais CCHO comparados aos animais SCHO salina e midazolam 3,0 nmol. O tratamento intra-CCA de midazolam 30 nmol aumentou o número de entradas no lado escuro da CCE nos animais CCHO comparados aos animais CCHO salina.

A Figura 5C mostra o efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-CCA sobre o tempo gasto no lado escuro (TLE) da CCE em camundongos expostos ao teste na CCE após passarem pelo modelo de TEPT.

A ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-CCA) revelou efeitos significativos para os fatores condição ($F_{1,51} = 24,97$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,51} = 20,41$; $p < 0,05$), e interação condição e tratamento ($F_{1,51} = 6,08$; $p < 0,05$).

O teste de Duncan revelou diminuição significativa sobre o tempo gasto no lado escuro (TLE) da CCE nos animais CCHO comparados aos animais SCHO salina e midazolam 3,0 nmol. O tratamento intra-CCA com as duas doses de midazolam (3,0 e 30 nmol) aumentou o tempo gasto no lado escuro da CCE nos animais CCHO comparados aos animais CCHO salina.

Figura 5. Efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-CCA sobre (A) a latência de entrada, (B) entradas no lado escuro (TLE), (C) tempo gasto no lado escuro (TLE) na CCE em camundongos (CCHO n=10 p/grupo; SCHO n=9 p/grupo). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) sobre a latência de entrada na CCE. *P < 0,05 comparado ao grupo salina CCHO (ANOVA de duas vias). #P < 0,05 comparado aos respectivos grupos salina e MDZ 3,0 nmol SCHO (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.



3.2. Córtex orbitofrontal

3.2.1. Resultados da histologia

A análise histológica confirmou que 65 camundongos receberam canulação positiva no COF (Fig. 6A e 6B). 32 animais foram utilizados para investigar a modulação da ansiedade e memória aversiva pelo modelo de TEPT para camundongos após administração intra-COF de salina ou CoCl_2 , [Experimento 1 – CCHO: Salina (n = 11) e CoCl_2 (n = 10); SCHO: Salina (n = 5) e CoCl_2 (n = 6)]. 33 animais foram utilizados para investigar o efeito do midazolam (3,0 e 30 nmol) intra-COF na modulação da ansiedade e memória aversiva pelo modelo de TEPT para camundongos [Experimento 2 – CCHO: Salina (n = 6), MDZ 3,0 nmol (n = 5) e MDZ 30,0 nmol (n = 6); SCHO: Salina (n = 6), MDZ 3,0 nmol (n = 5) e MDZ 30,0 nmol (n = 5)].

Figura 6A e 6B. Representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (2004). Os pontos pretos representam os animais que tiveram canulação positiva, os pontos em cinza representam aqueles canulados fora do COF.

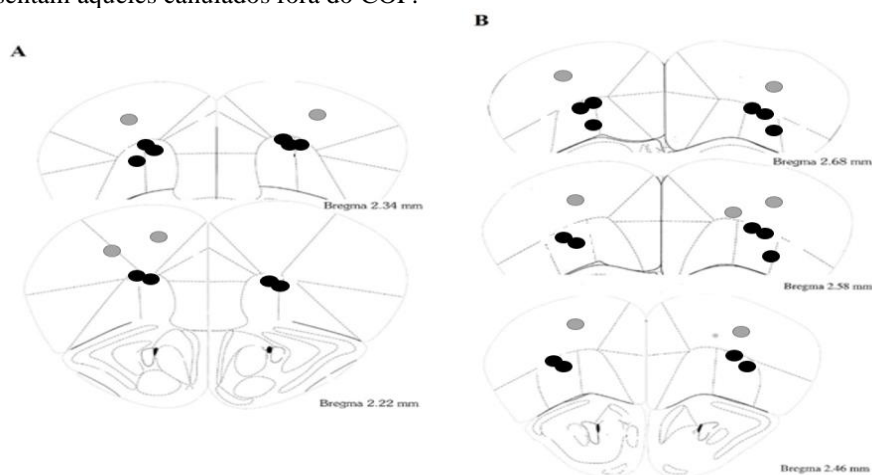
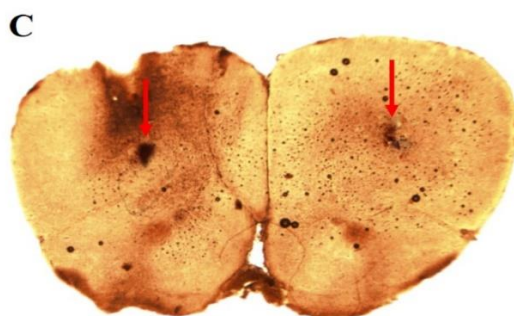


Figura 7C. Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo, demonstrando os locais de microinjeção intra-COF (setas vermelhas), Bregma 2,22mm. Fonte: próprio autor (2020).



3.2.2. Experimento 3. Efeito da inibição reversível do córtex orbitofrontal com cloreto de cobalto (CoCl₂) sobre o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos

As Figuras 8 (A, B e C) mostram o efeito do tratamento com salina e CoCl₂ intra-COF sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

Quanto à porcentagem entrada nos braços abertos (%EBA), a ANOVA de duas vias mostra que houve significância nos fatores condição ($F_{1,28} = 24,61$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,28} = 21,72$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,28} = 21,63$; $p < 0,05$).

O teste Duncan revelou aumento significativo na %EBA do grupo CCHO CoCl₂ tanto em comparação ao respectivo grupo salina quanto em comparação aos grupos SCHO (Fig. 8A).

Em relação à porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA), a ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos nos fatores condição ($F_{1,28} = 26,49$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,28} = 27,83$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,28} = 22,57$; $p < 0,05$).

O teste Duncan mostrou que houve aumento significativo na %TBA no grupo CCHO CoCl₂ tanto em comparação ao respectivo grupo salina quanto em comparação aos grupos SCHO (Fig. 8B).

Em relação às entradas nos braços fechados (EBF), a ANOVA de duas vias mostrou que não houve efeitos significativos nos fatores condição ($F_{1,28} = 1,19$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,28} = 1,19$; $p > 0,62$) e interação ($F_{1,28} = 2,60$; $p > 0,05$) (Fig. 8C).

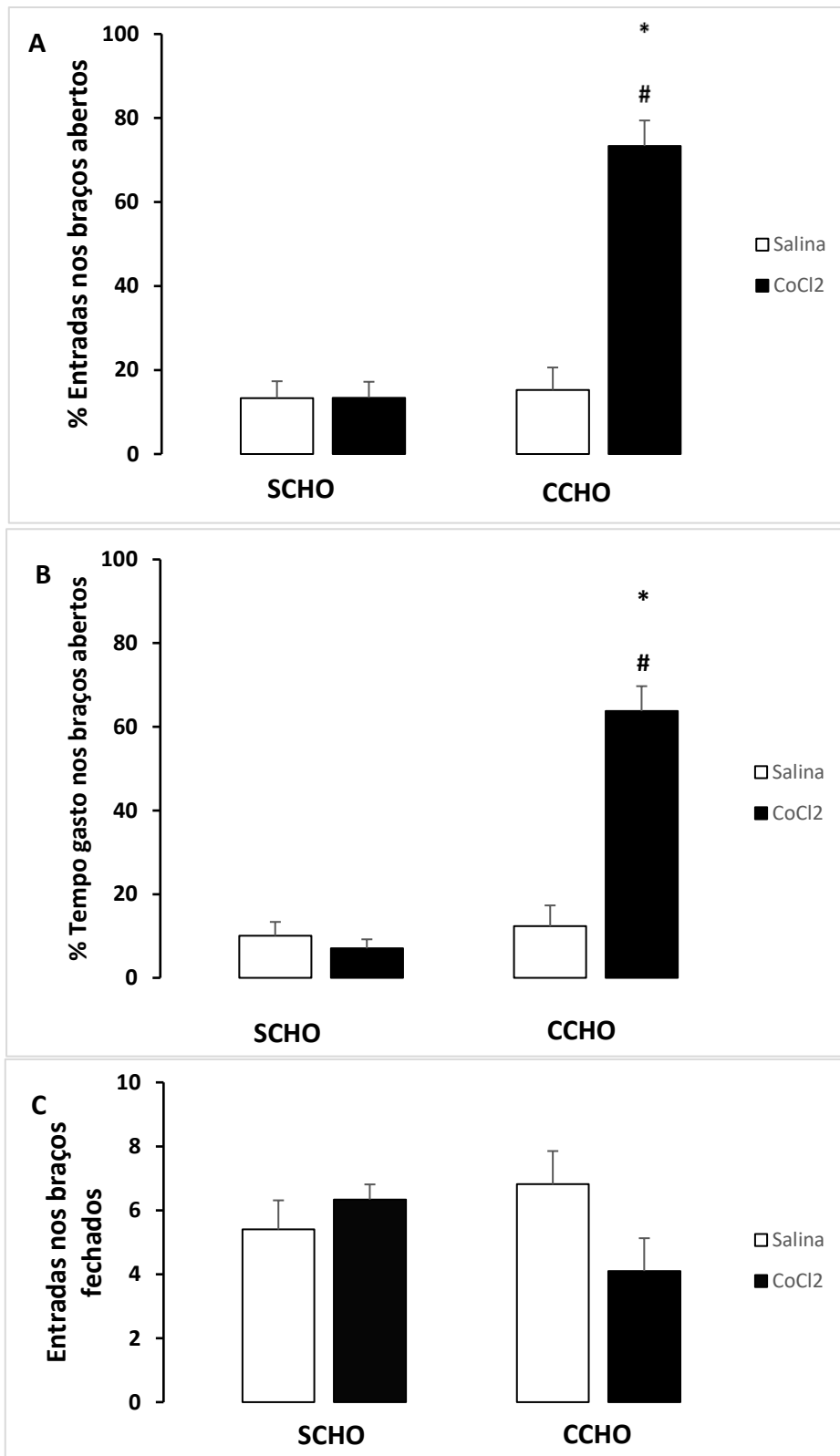


Figura 8. Efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-CCA sobre (A) a porcentagem de entradas nos braços abertos, (B) porcentagem de tempo nos braços abertos, (C) número de entradas nos braços fechados (CCHO n=11-10; SCHO n=5-6). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) sobre a latência de entrada na CCE. *P < 0,05 comparado ao grupo salina CCHO (ANOVA de duas vias). #P < 0,05 comparado aos grupos SCHO. CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.

A Tabela 4 mostra o efeito do tratamento com salina e CoCl_2 intra-COF sobre comportamentos de avaliação de risco em camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos em todos os fatores apenas em relação à porcentagem de esticar protegido (%SAP protegido) [condição, $F_{1,28} = 22,41$; $p < 0,05$; tratamento, $F_{1,28} = 16,94$; $p < 0,05$; e interação condição e tratamento, $F_{1,28} = 17,91$; $p < 0,05$]. Já quanto ao total de mergulhos e %mergulhos protegidos, a ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos na condição [total de mergulhos ($F_{1,28} = 4,37$; $p < 0,05$), %mergulhos protegidos ($F_{1,28} = 5,78$; $p < 0,05$)], sem mostrar efeito para o tratamento [total de mergulhos ($F_{1,28} = 0,33$; $p > 0,05$), %mergulhos protegidos ($F_{1,28} = 3,26$; $p > 0,05$)] e interação condição e tratamento [total de mergulhos ($F_{1,28} = 1,07$; $p > 0,05$), %mergulhos protegidos ($F_{1,28} = 3,26$; $p > 0,05$)].

O teste Duncan revelou diminuição significativa na %SAP protegido e %mergulho protegido nos animais do grupo CCHO tratado com CoCl_2 intra-COF em relação ao respectivo salina e aos grupos SCHO. Mas não revelou diferença entre os grupos quanto ao total de mergulhos.

A ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-COF) revelou que não houve efeitos significativos nos comportamentos: %tempo no centro (%TC) [condição ($F_{1,28} = 1,48$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,28} = 2,17$; $p > 0,05$), interação condição e tratamento ($F_{1,28} = 0,76$; $p > 0,05$)], total de SAP [condição ($F_{1,28} = 0,01$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,28} = 0,15$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,28} = 2,14$; $p > 0,05$)], total de levantamentos [condição ($F_{1,28} = 1,02$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,28} = 0,01$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,28} = 1,70$; $p > 0,05$)] e imobilidade (nulo).

Comportamentos	Sem Choque		Com Choque	
	Salina	CoCl ₂	Salina	CoCl ₂
%Tempo no Centro	29,8±5,3	26,8±4,9	28,1±4,4	16,2±2,6
Total de SAP	24,6±3,7	29,1±1,9	30,2±2,7	22,4±4,7
%SAP Protegido	89,1±3,2	89,9±2,8	85,9±5,2	32,2±7,0*
Total de Mergulhos	20,8±2,9	18,5±2,1	26,0±5,1	34,2±4,1
%Merg. Protegidos	83,3±6,1	83,4±5,4	77,9±9,2	44,7±7,1*
Levantamentos	7,6±1,3	10,0±1,7	8,0±1,3	6,1±1,2
Imobilidade	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Tabela 4. Efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto (CoCl₂) intra-COF sobre %Tempo no centro, o total de esticar (SAP), a % SAP protegido, total de mergulhos, % mergulhos protegidos, total de levantamentos e total de imobilidade no LCE em camundongos (CCHO n=11-10; SCHO n=5-6). Os valores representam as médias e o erro padrão da média (M±EPM) dos comportamentos avaliados no LCE. *P < 0,05 comparado ao grupo salina (ANOVA de duas vias).

3.2.3. Efeito do tratamento com salina e CoCl₂ intra-COF sobre o comportamento de camundongos expostos a CCE, após passarem pelo modelo de TEPT.

As figuras 9 (A, B e c) mostram o efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto intra-COF sobre o comportamento de camundongos expostos ao teste na CCE após passarem pelo modelo de TEPT.

Quanto à latência de entrada no lado escuro CCE, a ANOVA de duas vias mostrou que houve efeitos significativos nos fatores condição ($F_{1,28} = 11,56$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,28} = 12,33$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,28} = 11,93$; $p < 0,05$) (Fig. 9A).

O teste de Duncan revelou que houve diminuição significativa da latência no grupo CCHO CoCl₂ em relação ao respectivo salina, e aumento significativo da latência no grupo CCHO salina em comparação aos grupos SCHO.

Em relação ao número de entradas no lado escuro (ELE) da CCE, a ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos nos fatores: condição ($F_{1,28} = 4,35$, $p < 0,05$),

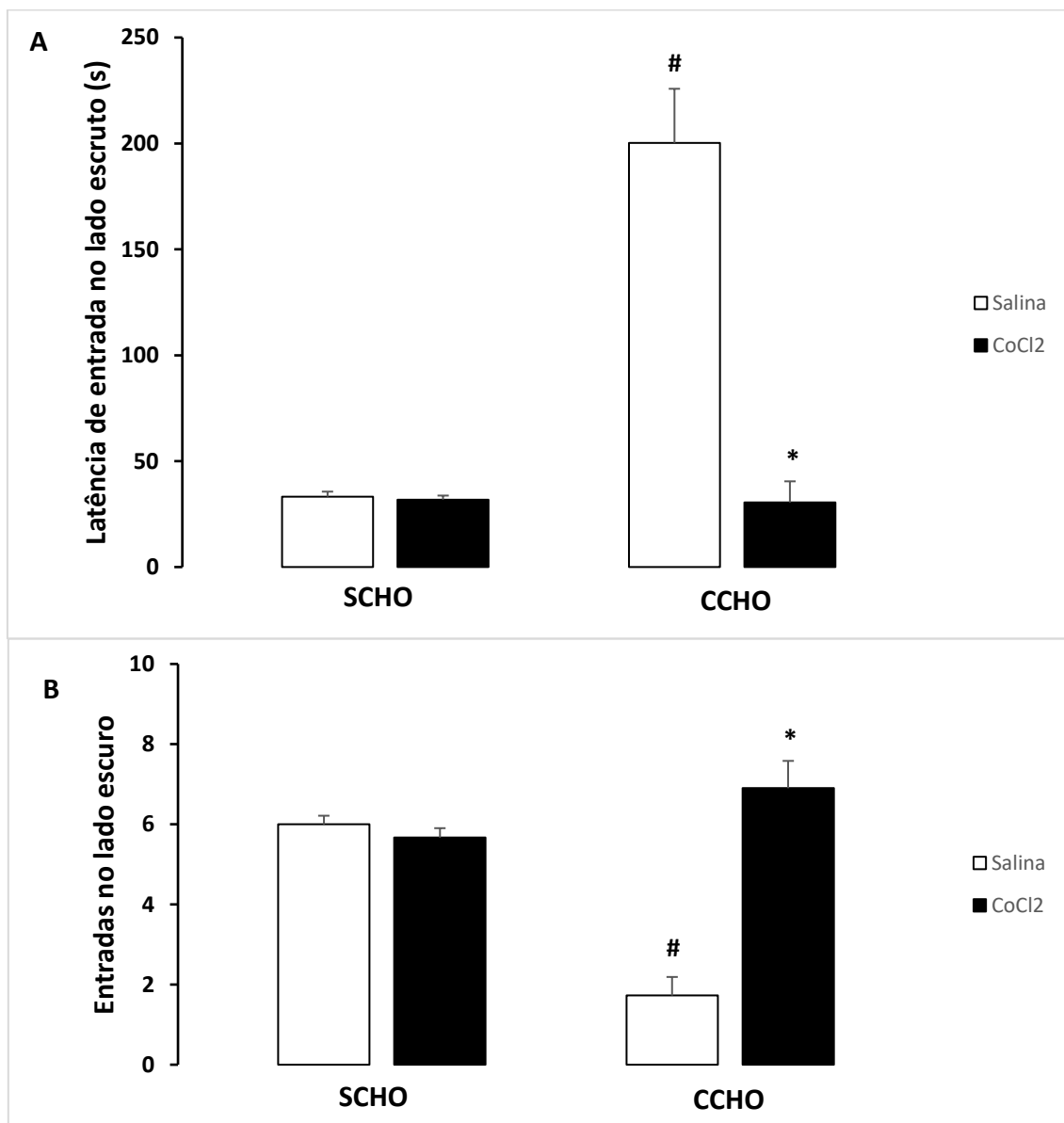
tratamento ($F_{1,28} = 11,05$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,28} = 14,30$; $p < 0,05$) (Fig. 9B).

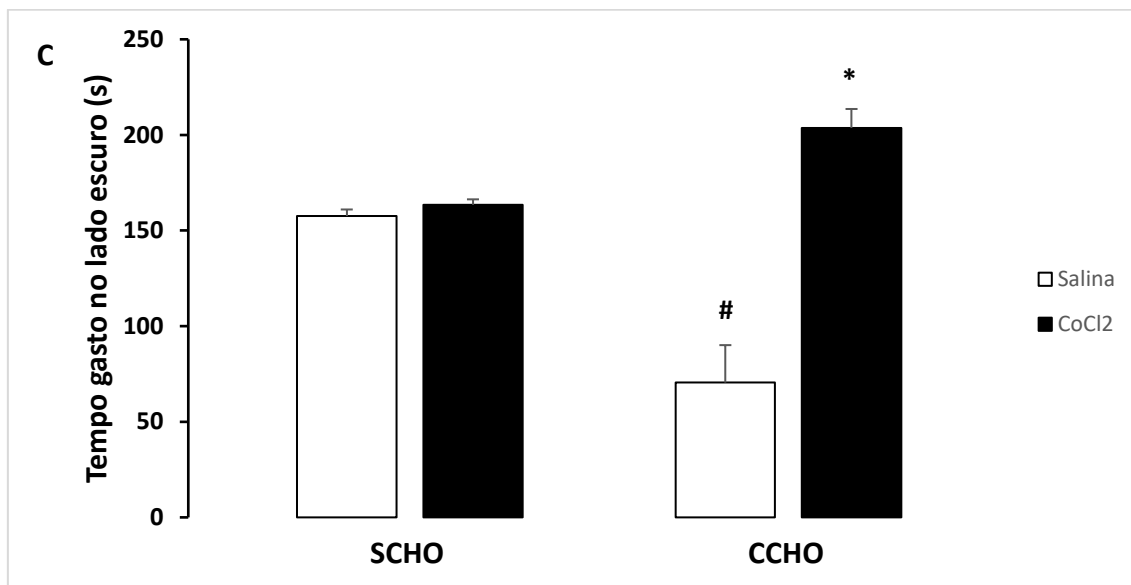
O teste Duncan revelou que houve aumento significativo na taxa de ELE no grupo CCHO CoCl_2 em comparação ao respectivo salina, e diminuição significativa no grupo CCHO salina em comparação aos grupos SCHO.

A respeito do tempo gasto no lado escuro da CCE, a ANOVA de duas vias mostrou que houve efeitos significativos nos fatores tratamento ($F_{1,28} = 10,85$; $p < 0,05$) e interação tratamento e condição ($F_{1,28} = 9,10$; $p < 0,05$), mas sem mostrar diferença na condição ($F_{1,28} = 1,23$; $p > 0,05$) (Fig. C).

O teste Duncan revelou que houve tanto a diminuição significativa no TLE no grupo CCHO salina em comparação aos grupos SCHO, e aumento significativo no TLE no grupo CCHO CoCl_2 em relação ao respectivo salina.

Figura 9. Efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto (CoCl₂) intra-COF sobre a (A) latência de entrada no lado escuro, (B) número de entradas no lado escuro (ELE), (C) tempo gasto no lado escuro (TLE) da CCE em camundongos (CCHO n=11-10; SCHO n=5-6). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do ELE da caixa CCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo salina, #P < 0,05 comparado aos grupos SCHO (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.





3.2.4. Experimento 4. Efeito do tratamento com midazolam no córtex orbitofrontal sobre o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

As Figuras 10 (A, B, C) mostram o efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-COF sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

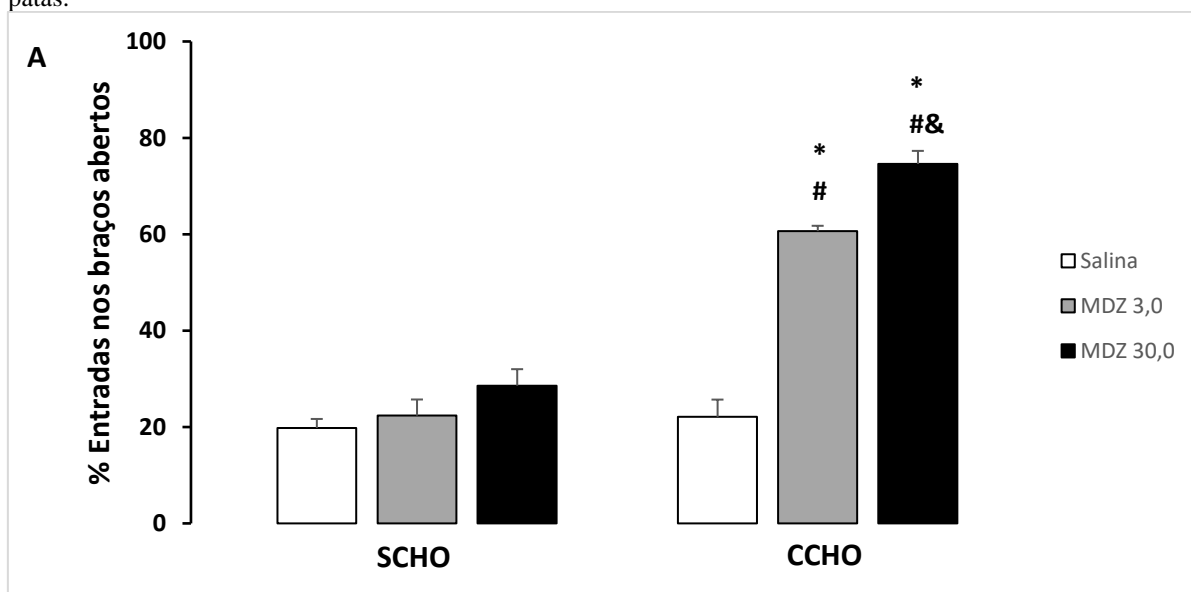
Quanto à porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), a ANOVA de duas vias mostrou que houve significância nos fatores: condição ($F_{2,27} = 107,12$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,27} = 44,06$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,27} = 24,62$; $p < 0,05$).

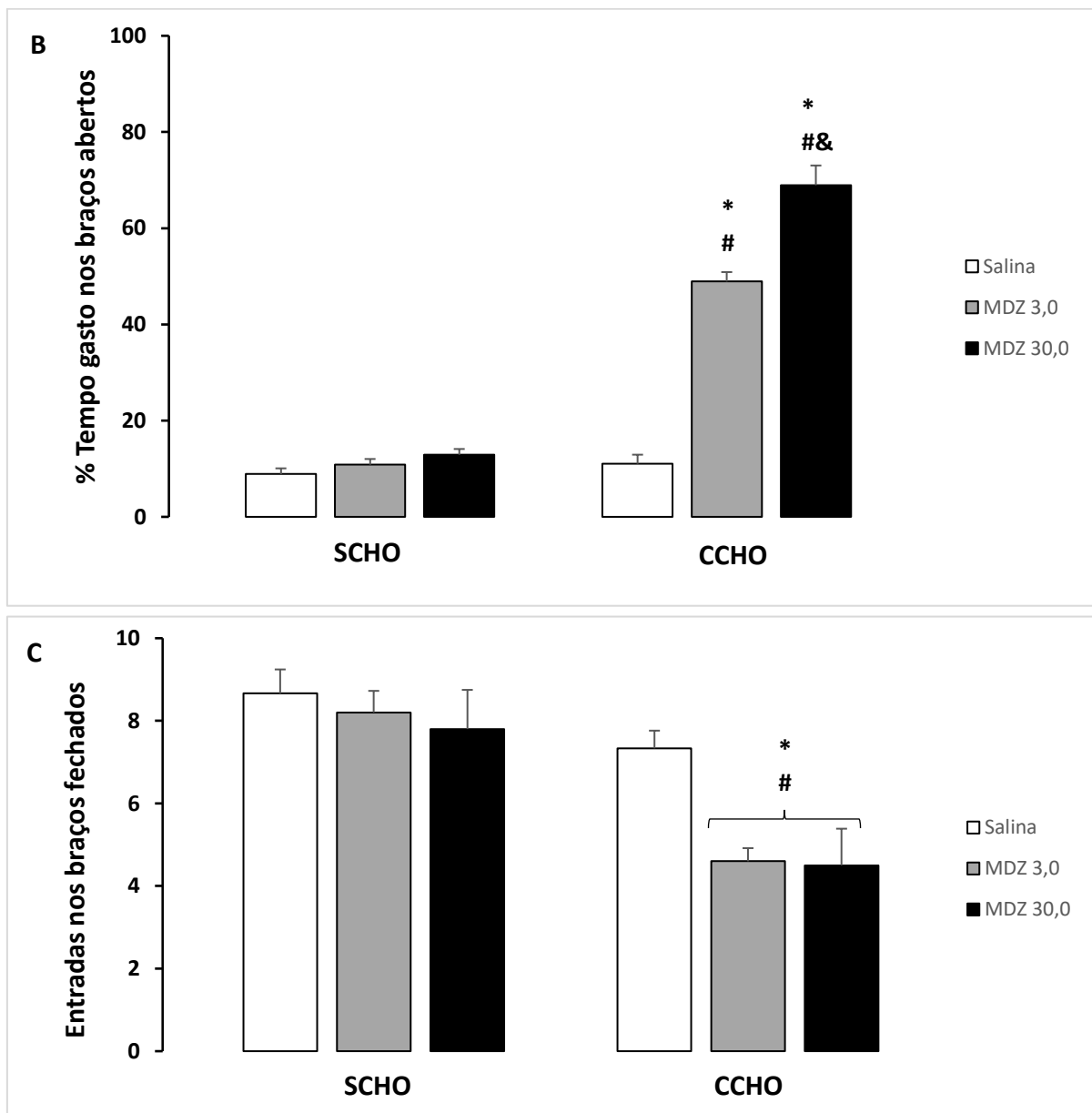
O teste de Duncan revelou que houve a diferença significativa na porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) tanto do grupo CCHO MDZ 3,0 quanto do grupo CCHO MDZ 30,0 em relação aos demais grupos, sendo que a %EBA do grupo CCHO MDZ 3,0 foi menor que a do grupo CCHO MDZ 30,0 (Fig. 10A). O mesmo foi observado quanto à %TBA (condição, $F_{2,27} = 209,08$; $p < 0,05$; tratamento, $F_{2,27} = 70,31$; $p < 0,05$; interação, $F_{2,27} = 53,8$; $p < 0,05$) (Fig. 10B).

A ANOVA de duas vias mostrou que houve significância nos fatores condição ($F_{2,27} = 17,89$; $p < 0,05$) e tratamento ($F_{2,27} = 3,36$; $p < 0,05$), mas sem mostrar resultado na interação ($F_{2,27} = 1,24$; $p > 0,05$) (Fig. 10C).

O teste Duncan revelou diminuição significativa na entrada dos braços fechados (EBF) nos grupos CCHO MDZ 3,0 e 30,0 em comparação ao respectivo salina e em relação aos grupos SCHO. No entanto, não houve registro de imobilidade.

Figura 10. Efeito do tratamento com salina e midazolam (MDZ, 3,0 e 30 nmol) intra-COF, sobre as (A) porcentagem de entradas (%EBA), (B) porcentagem de tempo (%TBA), (C) entradas nos braços fechados (EBF) do LCE em camundongos (CCHO n=6-5-6; SCHO n=6-5-5). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) da %EBA do LCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo salina, #P < 0,05 comparado aos grupos SCHO, &P comparado ao respectivo MDZ 3,0nmol (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.





A Tabela 5 mostra o efeito do tratamento com salina, MDZ 3,0nmol e MDZ 30,0nmol intra-COF sobre comportamentos de avaliação de risco em camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos em todos os fatores apenas em relação à porcentagem de esticar protegido (%SAP protegido) [condição ($F_{2,27} = 115,28$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,27} = 45,29$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,27} = 45,03$; $p < 0,05$)] e porcentagem de mergulho protegido [condição ($F_{2,27} = 110,39$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,27} = 47,91$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,27} =$

21,54; $p < 0,05$]. Já quanto ao total de SAP, a ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos na interação condição e tratamento ($F_{2,27} = 7,25$; $p < 0,05$), sem mostrar efeito para o tratamento ($F_{2,27} = 3,26$; $p > 0,05$) e tratamento ($F_{2,27} = 2,07$; $p > 0,05$). Em relação ao total de levantamentos, a ANOVA de duas vias mostrou efeito para a condição ($F_{2,27} = 22,16$; $p < 0,05$), sem mostrar diferença para o tratamento ($F_{2,27} = 3,06$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,27} = 3,30$; $p > 0,05$).

O teste Duncan revelou diminuição significativa na %SAP protegido e %mergulho protegido nos animais do grupo CCHO tratados com MDZ 3,0 e 30,0nmol em relação ao respectivo salina e aos grupos SCHO, de modo que essas taxas foram ainda menores no grupo CCHO MDZ 30,0 em relação ao respectivo MDZ 3,0nmol. Em relação ao Total de SAP, o teste de Duncan revelou diminuição significativa no grupo CCHO MDZ 30,0 em relação aos respectivos grupos salina e MDZ 3,0 e em comparação aos grupos SCHO MDZ 3,0 e 30,0nmol. Além disso, o teste Duncan revelou diminuição significativa no total de levantamentos nos grupos CCHO MDZ 3,0 e 30,0nmol em relação ao respectivo salina e grupos SCHO, mas, dessa vez, sem mostrar diferentes entre eles em si.

A ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-COF) revelou que não houve efeitos significativos nos comportamentos: %tempo no centro (%TC) [condição ($F_{2,27} = 0,002$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{2,27} = 2,45$; $p > 0,05$), interação condição e tratamento ($F_{2,27} = 2,38$; $p > 0,05$)], total de mergulhos [condição ($F_{2,27} = 0,09$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{2,27} = 2,22$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,27} = 0,35$; $p > 0,05$)] e imobilidade (nulo).

Tabela 5. Efeito do tratamento com salina e midazolam (MDZ) intra-COF sobre % Tempo no centro, o total de esticar (SAP), a % SAP protegido, total de mergulhos, % mergulhos protegidos, total de levantamentos e total de imobilidade no LCE em camundongos (CCHO n=5-6; SCHO n=5-6). Os valores representam as médias e o erro padrão da média (M±EPM) dos comportamentos avaliados no LCE. *P < 0,05 comparado aos demais grupos. #P < 0,05 comparado ao respectivo salina, #P < 0,05 comparado aos grupos SCHO, &P comparado ao respectivo MDZ 3,0nmol (ANOVA de duas vias).

Comportamentos	Sem Choque			Com Choque		
	Salina	MDZ 3,0	MDZ 30,0	Salina	MDZ 3,0	MDZ 30,0
%Tempo no Centro	19,2±3,5	17,7±2,8	21,3±2,1	27,5±2,2	14,3±3,0	16,7±2,3
Total de SAP	42,5±1,2	50,4±1,1	49,2±2,9	49,8±0,6	44,8±1,8	41,0±1,6*#&
%SAP Protegido	82,4±1,2	88,8±0,6	81,0±1,9	87,5±1,4	51,0±2,3*#	29,4±2,2*#&
Total de Mergulhos	36,1±1,0	38,0±1,0	40,6±0,9	38,0±1,5	36,2±1,2	42,3±1,6
%Merg. Protegidos	82,5±2,2	79,2±2,0	72,1±0,7	74,0±1,1	52,9±2,5*#	20,8±1,7*#&
Levantamentos	11,1±0,6	11,6±0,7	11,2±0,4	9,8±0,8	6,0±0,8*#	3,8±0,5*#
Imobilidade	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

3.2.5. Efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-COF sobre o comportamento de camundongos expostos a CCE, após passarem pelo modelo de TEPT.

As Figuras 11 (A, B e C) mostram o efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-COF sobre o comportamento de camundongos expostos ao teste na CCE após passarem pelo modelo de TEPT.

Quanto à latência de entrada no lado escuro da CCE, a ANOVA de duas vias mostrou significância para o fator condição ($F_{2,27} = 69,66$; $p < 0,05$), mas sem mostrar diferença no tratamento ($F_{2,27} = 1,67$; $p > 0,05$) e interação ($F_{2,27} = 1,69$; $p > 0,05$).

O teste de Duncan revelou que enquanto os grupos CCHO salina e MDZ 3,0nmol demonstraram tempo significativamente maior de latência em comparação aos grupos SCHO, o grupo CCHO MDZ 30,0 nmol teve uma taxa ainda maior que os respectivos salina e MDZ 3,0nmol (Fig. 11A).

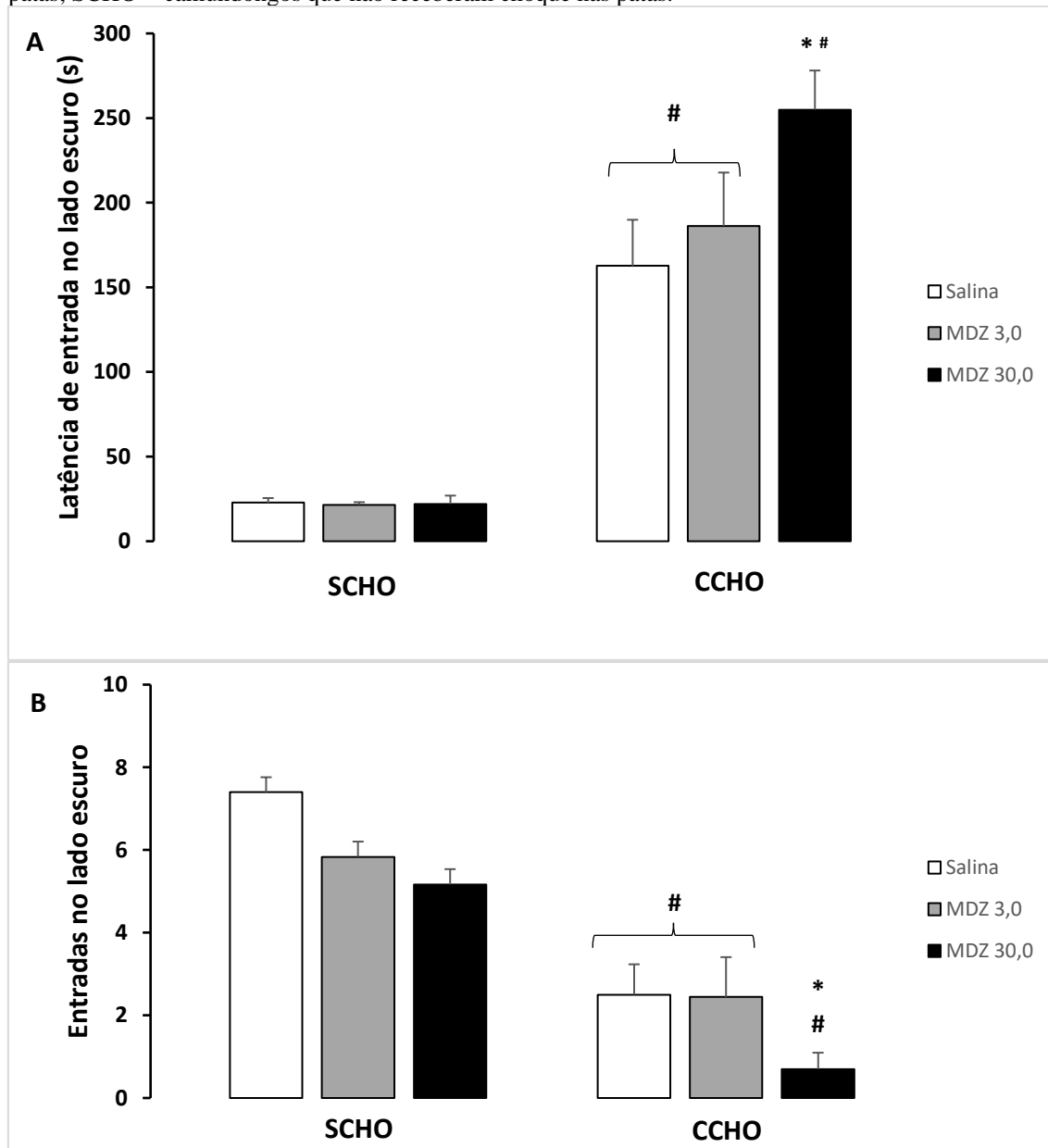
Em relação à taxa de ELE, a ANOVA de duas vias mostrou significância nos fatores condição ($F_{2,27} = 49,5$; $p < 0,05$) e tratamento ($F_{2,27} = 3,76$; $p < 0,05$), mas sem mostrar diferença na interação ($F_{2,27} = 0,54$; $p > 0,05$).

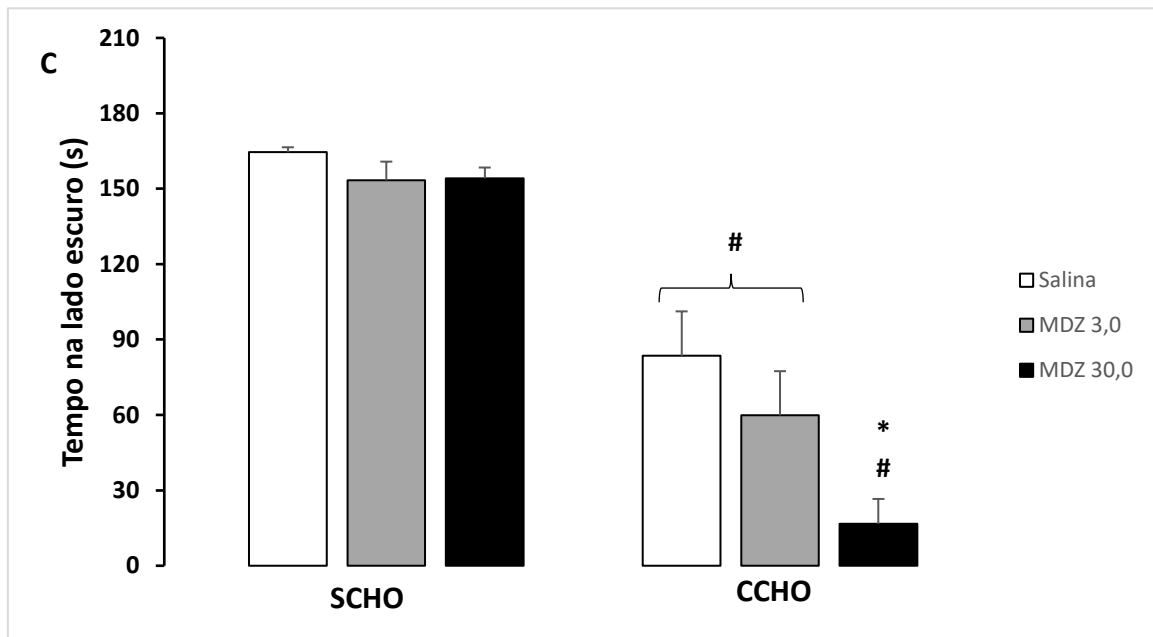
O teste Duncan revelou que enquanto os grupos CCHO salina e MDZ 3,0nmol demonstraram menor taxa de ELE em comparação aos grupos SCHO, o grupo CCHO MDZ 30,0nmol teve uma taxa ainda menor que os respectivos salina e MDZ 3,0 (Fig. 11B).

A respeito do TLE, a ANOVA de duas vias mostrou que houve significância nos fatores condição ($F_{2,27} = 70,27$; $p < 0,05$) e tratamento ($F_{2,27} = 3,23$; $p < 0,05$), mas mostrar diferença na interação ($F_{2,27} = 1,93$; $p > 0,05$).

O teste Duncan revelou que enquanto os grupos CCHO salina e MDZ 3,0nmol demonstraram menor taxa no TLE em comparação aos grupos SCHO, o grupo CCHO MDZ 30,0 teve uma taxa ainda menor que os respectivos salina e MDZ 3,0 (Fig. 11C).

Figura 11. Efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-COF sobre o (A) latência de entrada, (B) número de entradas no lado escuro (ELE), (C) tempo no lado escuro da CCE em camundongos (CCHO n=5-6; SCHO n=5-6). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do ELE da caixa CCE. *P < 0,05 comparado aos respectivos salina e MDZ 3,0nmol, #P < 0,05 comparado aos grupos SCHO (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.





3.3. Ínsula

3.3.1. Resultados da histologia

A análise histológica confirmou que 70 camundongos receberam canulação positiva na ínsula (Fig. 12Ae 12B). 30 animais foram utilizados para investigar a modulação da ansiedade e memória aversiva pelo modelo de TEPT para camundongos após administração intra-ínsula de salina ou CoCl_2 , [Experimento 1 – CCHO: Salina (n = 8) e CoCl_2 (n = 8); SCHO: Salina (n = 8) e CoCl_2 (n = 6)]. 40 animais foram utilizados para investigar o efeito do midazolam (3,0 e 30 nmol) intra-ínsula na modulação da ansiedade e memória aversiva pelo modelo de TEPT para camundongos [Experimento 2 – CCHO: Salina (n = 9), MDZ 3,0 nmol (n = 7) e MDZ 30,0 nmol (n = 8); SCHO: Salina (n = 6), MDZ 3,0 nmol (n = 5) e MDZ 30,0 nmol (n = 5)].

Figura 12A e 12B. Representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (2004). Os pontos pretos representam os animais que tiveram canulação positiva, os pontos em cinza representam aqueles canulados fora da ínsula.

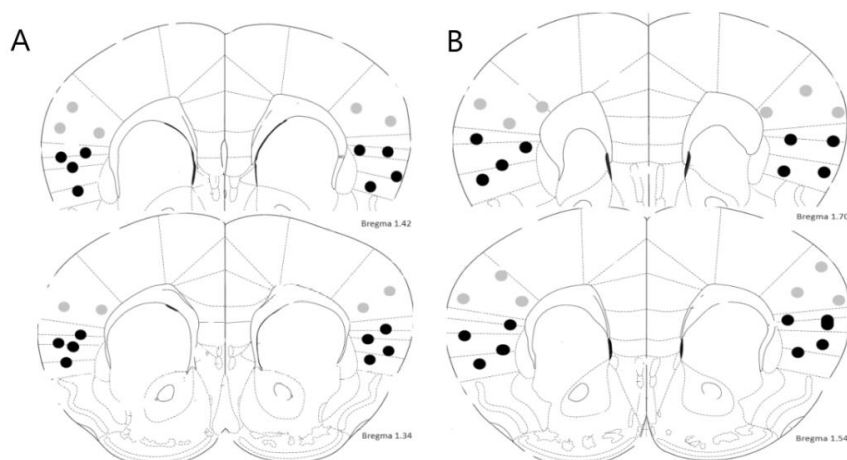
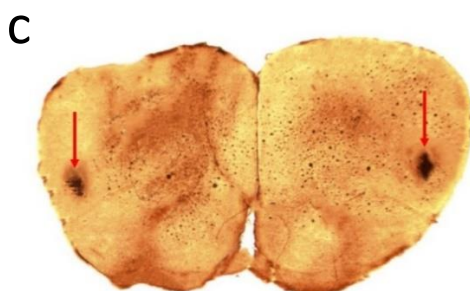


Figura 12C. Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo, demonstrando os locais de microinjeção intra-ínsula (setas vermelhas), Bregma 2,21mm. Fonte: próprio autor (2020).



3.3.2. Experimento 5. Efeito da inibição reversível da ínsula com cloreto de cobalto (CoCl₂) sobre o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos

As Figuras 13 (A, B e C) mostram o efeito do tratamento com salina e CoCl₂ intra-ínsula sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

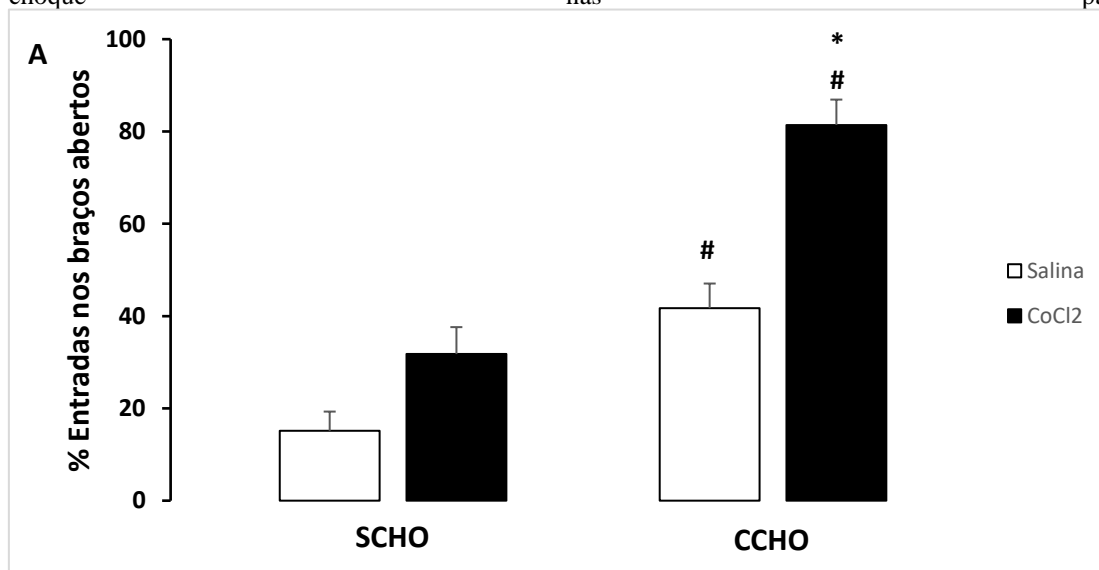
Quanto à %EBA, a ANOVA de duas vias demonstra que houve significância nos fatores condição ($F_{1,26} = 41,31$; $p < 0,05$) e tratamento ($F_{1,26} = 22,57$; $p < 0,05$), mas sem mostrar diferença na relação condição e tratamento ($F_{1,26} = 3,78$; $p > 0,05$).

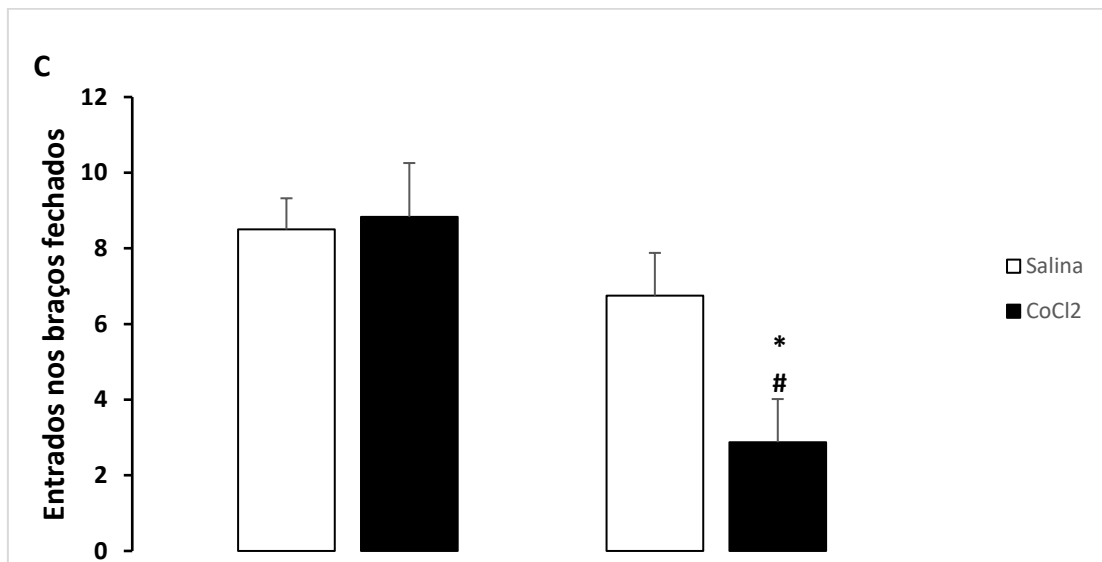
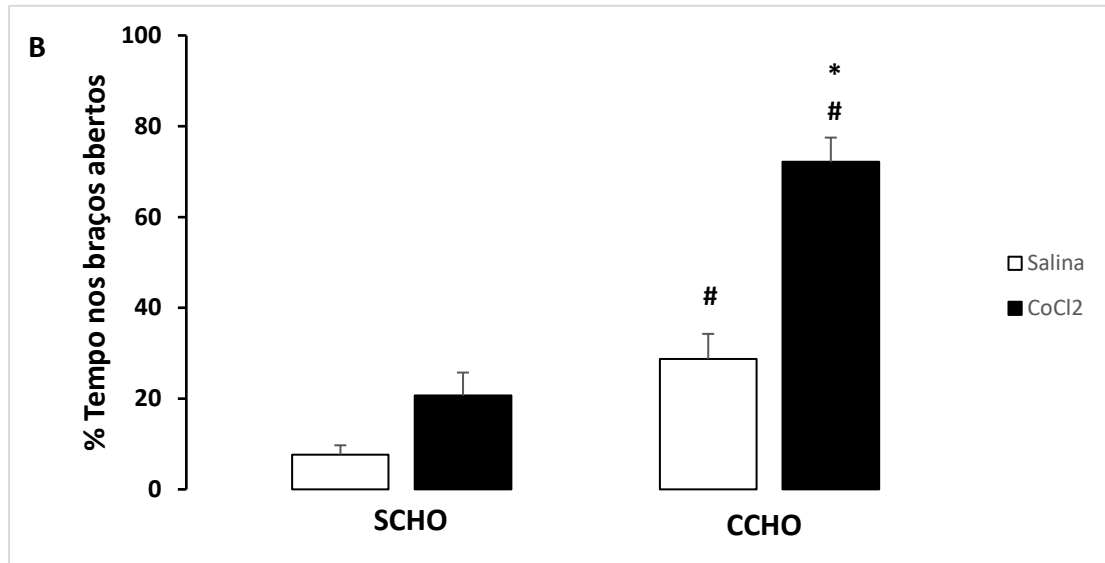
O teste Duncan mostrou aumentou na %EBA nos grupos CCHO Salina e CoCl₂ em comparação aos grupos SCHO, sendo que a porcentagem do grupo CCHO CoCl₂ foi ainda maior que seu respectivo salina (Fig. 13A). O mesmo padrão comportamental foi observado em relação à %TBA, só que com significância em todos os fatores (condição, $F_{1,26} = 55,51$, $p < 0,05$; tratamento, $F_{1,26} = 33,51$, $p < 0,05$; interação, $F_{1,26} = 9,74$, $p < 0,05$) (Fig. 13B).

A respeito da taxa de EBF, o teste ANOVA de duas vias mostrou significância no fator condição ($F_{1,26} = 10,83$; $p < 0,05$), mas sem mostrar diferença no tratamento ($F_{1,26} = 2,28$; $p > 0,05$) e interação ($F_{1,26} = 3,22$; $p > 0,05$) (Fig. 13C).

O teste de Duncan revelou demonstra que houve diminuição da taxa de EBF no grupo CCHO CoCl₂ em comparação ao respectivo salina e em relação aos grupos SCHO. Porém, não houve registro de imobilidade.

Figura 13. Efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto (CoCl₂) intra-ínsula sobre as (A) porcentagens de entradas (%EBA), (B) %TBA, (C) EBF do LCE em camundongos (CCHO n=8-8; SCHO n=8-6) as colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) das %EBA nos braços abertos do LCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo salina, #P comparado aos grupos SCHO (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque





A Tabela 6 mostra o efeito do tratamento com salina e CoCl_2 intra-ínsula sobre os comportamentos de avaliação de risco em camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos em todos os fatores apenas em relação à porcentagem de esticar protegido (%SAP protegido) [condição ($F_{1,26} = 46,29$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,26} = 24,28$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,26} = 7,13$; $p < 0,05$)]. Já quanto à porcentagem de mergulho protegido e total de levantamentos, houve significância nos fatores condição [%mergulho protegido ($F_{1,26} = 20,55$; $p < 0,05$), total de levantamentos ($F_{1,26} = 15,29$; $p < 0,05$)] e tratamento [%mergulhos protegidos ($F_{1,26} = 18,57$; $p < 0,05$), total de levantamentos ($F_{1,26} = 5,38$; $p < 0,05$)], mas sem mostrar diferença na interação condição e tratamento [%mergulhos protegidos ($F_{1,26} = 1,00$; $p > 0,05$), levantamentos ($F_{1,26} = 1,42$; $p > 0,05$)]. Além disso, quanto ao total de mergulhos, a ANOVA de duas vias mostrou diferença nos fatores condição ($F_{1,26} = 6,63$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,26} = 10,05$; $p < 0,05$), mas sem mostrar significância no tratamento ($F_{1,26} = 3,85$; $p > 0,05$).

O teste Duncan revelou diminuição significativa na %SAP protegido, %mergulho protegido e total de levantamentos nos animais do grupo CCHO tratados com CoCl_2 em relação ao respectivo salina e aos grupos SCHO. Além disso, o grupo CCHO salina demonstrou uma taxa menor que o grupo SCHO salina em relação à %SAP protegido e %mergulhos protegidos. Por fim, o grupo SCHO CoCl_2 demonstrou uma taxa menor de mergulhos protegidos em relação ao respectivo salina.

A ANOVA de duas vias (condição e tratamento intra-ínsula) revelou que não houve efeitos significativos nos comportamentos: %tempo no centro (%TC) [condição ($F_{1,26} = 0,01$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,26} = 1,79$; $p > 0,05$), interação condição e tratamento ($F_{1,26} = 3,50$; $p > 0,05$)], total de SAP [condição ($F_{1,26} = 0,26$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,26}$

= 0,12; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,26} = 1,56$; $p > 0,05$) e imobilidade (nulo).

Tabela 6. Efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto (CoCl_2) intra-COF sobre %Tempo no centro, o total de esticar (SAP), a % SAP protegido, total de mergulhos, % mergulhos protegidos, total de levantamentos e total de imobilidade no LCE em camundongos (CCHO n=8-8; SCHO n=8-6). Os valores representam as médias e o erro padrão da média ($M \pm \text{EPM}$) dos comportamentos avaliados no LCE. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo salina, # $P < 0,05$ comparado aos grupos SCHO (ANOVA de duas vias).

Comportamentos	Sem Choque		Com Choque	
	Salina	CoCl_2	Salina	CoCl_2
%Tempo no Centro	17,3 \pm 1,7	19,0 \pm 2,8	23,6 \pm 4,3	13,6 \pm 2,3
Total de SAP	39,0 \pm 2,0	42,6 \pm 2,6	46,2 \pm 2,2	39,6 \pm 3,3
%SAP Protegido	92,4 \pm 1,7	79,4 \pm 3,6	68,5 \pm 4,4 [#]	24,6 \pm 4,3 ^{*#}
Total de Mergulhos	28,2 \pm 3,1	22,6 \pm 1,3	25,5 \pm 2,0	49,2 \pm 4,0 ^{**}
%Merg. Protegidos	85,5 \pm 2,2	59,9 \pm 6,7 [*]	58,1 \pm 6,1 [#]	16,9 \pm 3,9 ^{*#}
Levantamentos	17,1 \pm 0,8	15,0 \pm 1,2	12,0 \pm 1,5	5,3 \pm 1,1 ^{*#}
Imobilidade	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

3.3.4. Efeito do tratamento com salina e CoCl_2 intra-ínsula sobre o comportamento de camundongos expostos a CCE, após passarem pelo modelo de TEPT.

As Figuras 14 (A, B, C) mostram o efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto intra-ínsula sobre o comportamento de camundongos expostos ao teste na CCE após passarem pelo modelo de TEPT.

Quanto à latência de entrada no lado escuro da CCE, a ANOVA de duas vezes mostra que houve significância na condição ($F_{1,26} = 19,12$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,26} = 21,77$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,26} = 20,19$; $p < 0,05$) (Fig. 14A).

O teste Duncan revelou aumento significativa na latência de entrada no lado escuro da CCE no grupo CCHO salina em comparação aos grupos SCHO, e diminuição significativa no grupo CCHO CoCl_2 em relação ao respectivo salina.

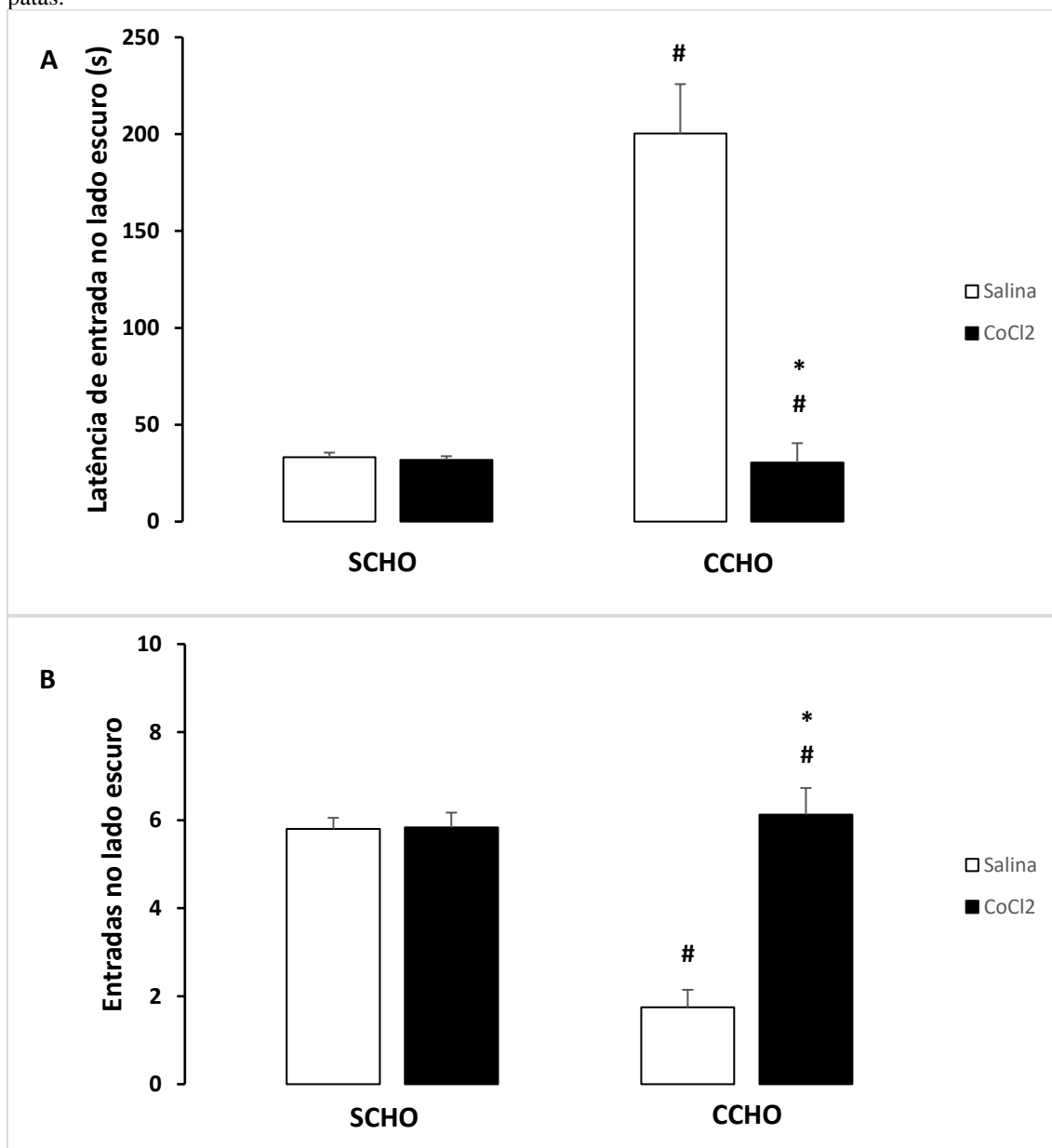
Em relação a taxa de ELE, a ANOVA de duas vezes mostrou significância nos fatores condição ($F_{1,26} = 7,74$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,26} = 10,65$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,26} = 10,33$; $p < 0,05$) (Fig. 14B).

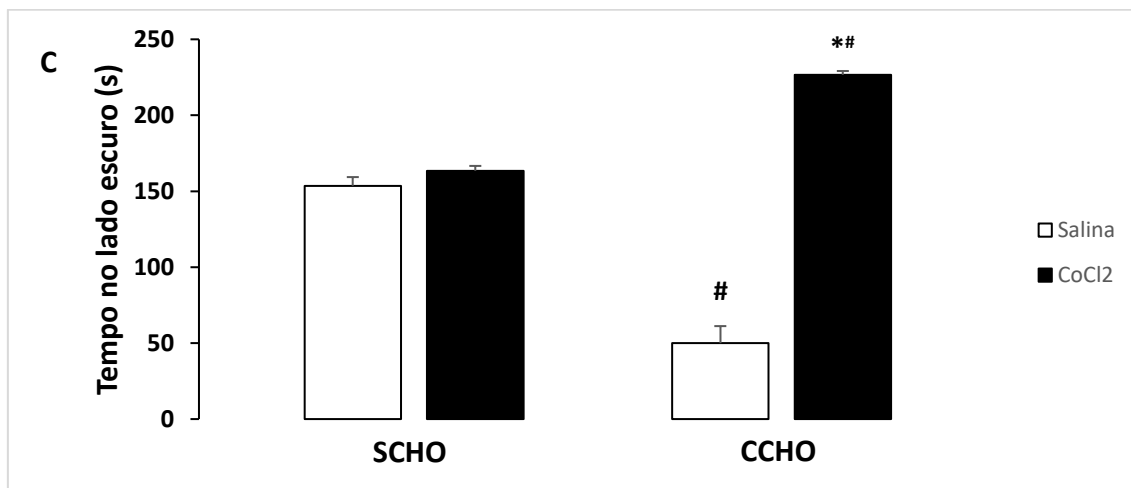
O teste Duncan revelou diminuição significativa nas ELE da CCE no grupo CCHO salina em comparação aos grupos SCHO, e aumento significativa no grupo CCHO CoCl_2 em relação ao respectivo salina.

Em relação ao TLE, a ANOVA de dois fatores mostra que houve significância nos fatores tratamento ($F_{1,26} = 14,83$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{1,26} = 11,11$; $p < 0,05$), mas sem mostrar diferença na condição ($F_{1,26} = 0,0002$; $p > 0,05$) (Fig. 14C).

O teste Duncan revelou diminuição significativa no TLE da CCE no grupo CCHO salina em comparação aos grupos SCHO, e aumento significativa no grupo CCHO CoCl_2 em relação ao respectivo salina.

Figura 14. Efeito do tratamento com salina e cloreto de cobalto (CoCl_2) intra-COF sobre a (A) latência de entrada no lado escuro, (B) número de entradas no lado escuro (ELE), (C) tempo gasto no lado escuro (TLE) no lado escuro da CCE em camundongos (CCHO n=11-10; SCHO n=5-6). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) da latência para entrada no lado escuro da caixa CCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo salina, #P comparado aos grupos SCHO (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.





3.3.5. Experimento 6. Efeito do tratamento com midazolam na ínsula sobre o aumento da ansiedade induzida pelo modelo de TEPT em camundongos.

As Figuras 15 (A, B e C) mostram o efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-ínsula sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

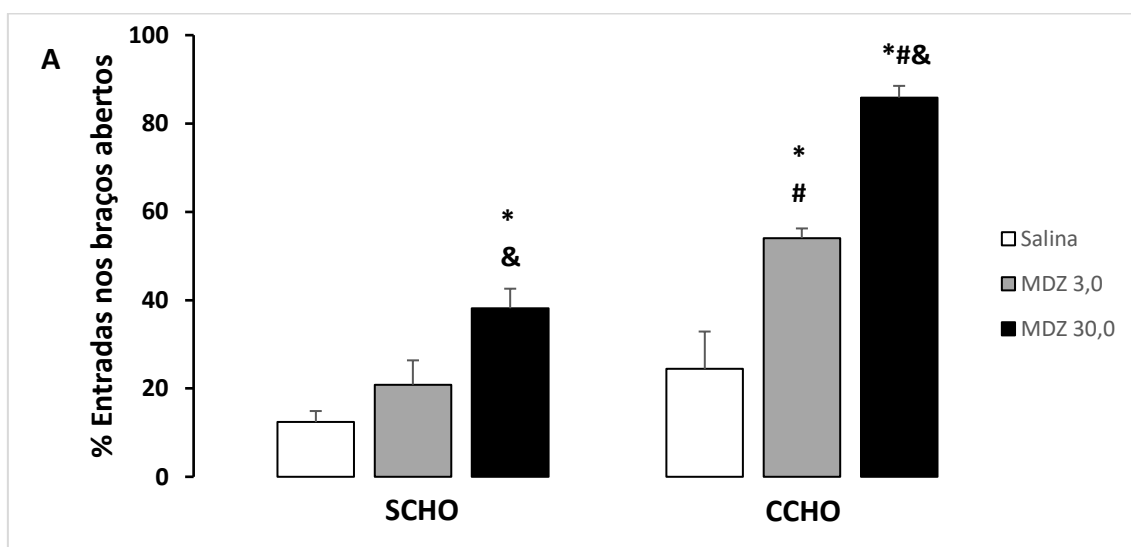
Quanto à %EBA, a ANOVA de duas vias mostrou que houve significância nos fatores condição ($F_{2,34} = 43,96$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,34} = 30,39$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 5,19$; $p < 0,05$) (Fig. 15A).

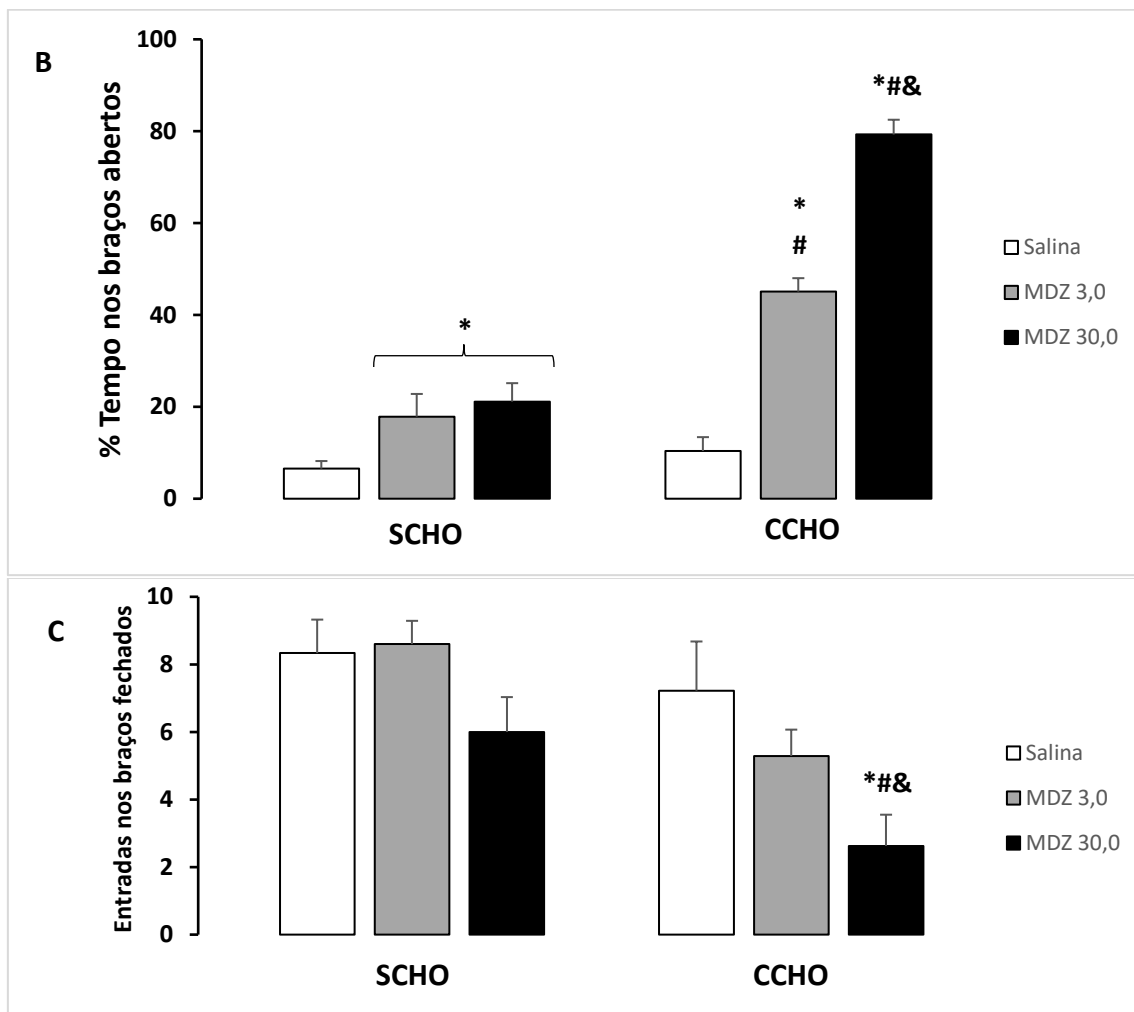
O teste Duncan revelou que houve aumento significativo da %EBA no grupo CCHO MDZ 30,0nmol em comparação aos respectivos salina e MDZ 3,0 e em relação aos grupos SCHO. Também houve aumento da %EBA no grupo CCHO MDZ 3,0nmol em comparação ao respectivo salina e em relação aos grupos SCHO. Além disso, o grupo SCHO MDZ 30,0nmol mostrou aumento da %EBA em comparação aos respectivos salina e MDZ 3,0nmol (Fig. 15A). Algo similar ocorreu quanto à %TBA, só que, nesse caso, ambos os grupos SCHO MDZ 3,0 e 30,0nmol tiveram aumento significativo em relação ao respectivo grupo salina [condição ($F_{2,34} = 96,47$; $p < 0,05$), tratamento, $F_{2,34} = 66,95$; $p < 0,05$), interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 28,07$; $p < 0,05$)] (Fig. 15B).

Já a respeito do EBF, a ANOVA de duas vias mostrou significância nos fatores condição ($F_{2,34} = 7,25$; $p < 0,05$) e tratamento ($F_{2,34} = 4,76$; $p < 0,05$), mas sem mostrar diferença na interação ($F_{2,34} = 0,63$; $p > 0,05$) (Fig. 15C).

O teste Duncan revelou que houve diminuição significativa na entrada dos braços fechados (EBF) no grupo CCHO MDZ 30,0 em comparação aos respectivos salina e MDZ 3,0nmol e em relação aos grupos SCHO. No entanto, não houve registro de imobilidade.

Figura 15. Efeito do tratamento com salina e midazolam (MDZ, 3,0 e 30 nmol) intra-ínsula, sobre as (A) porcentagens de entradas (%EBA), (B) porcentagens de entradas (%EBA), (C) entradas nos braços fechados (EBF) do LCE em camundongos (CCHO n=7-9; SCHO n=5-6). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) da %EBA do LCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo salina, #P < 0,05 comparado aos grupos SCHO, &P < 0,05 comparado ao respectivo MDZ 3,0nmol (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.





A Tabela 7 mostra o efeito do tratamento com salina, MDZ 3,0nmol e MDZ 30,0nmol intra-ínsula sobre os comportamentos de avaliação de risco em camundongos expostos ao LCE após passarem pelo modelo de TEPT.

A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos em todos os fatores apenas em relação à porcentagem de esticar protegido (%SAP protegido) [condição ($F_{2,34} = 47,94$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,34} = 23,47$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 16,67$; $p < 0,05$)], %mergulhos protegidos [condição ($F_{2,34} = 39,92$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,34} = 25,88$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 11,80$; $p < 0,05$)] e total de mergulhos [condição ($F_{2,34} = 18,88$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,34} = 11,39$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 3,44$; $p < 0,05$)].

Já quanto à porcentagem de tempo no centro (%TC), houve significância na interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 8,51$; $p < 0,05$), sem mostrar diferença na condição ($F_{2,34} = 0,25$; $p > 0,05$) e tratamento ($F_{2,34} = 0,25$; $p > 0,10$). Em respeito ao total de SAP, a ANOVA de duas vias mostrou significância no tratamento ($F_{2,34} = 6,98$; $p < 0,05$), mas sem mostrar diferença na condição ($F_{2,34} = 2,37$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 3,18$; $p > 0,05$). Por sua vez, no total de levantamentos só houve significância na condição ($F_{2,34} = 4,30$; $p < 0,05$), não havendo diferença no tratamento ($F_{2,34} = 1,67$; $p > 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 0,20$; $p > 0,05$).

O teste Duncan revelou que o grupo CCHO MDZ 30,0nmol apresentou: 1) diminuição significativa na %tempo no centro em comparação ao respectivo salina; 2) diminuição no total de SAP em comparação aos respectivos salina e MDZ 3,0nmol; 3) diminuição na %SAP protegido e %mergulhos protegidos em comparação aos respectivos salina e MDZ 3,0nmol, e em relação aos grupos SCHO; 4) diminuição no total de levantamentos em relação aos grupos SCHO; e 5) aumento significativo no total de mergulhos em comparação aos respectivos salina e MDZ 3,0nmol, e em relação aos grupos SCHO.

Já o grupo CCHO MDZ 3,0nmol apresentou diminuição significativa na %SAP protegido e %mergulhos protegidos em comparação ao respectivo salina, e em relação aos grupos SCHO. Além disso, apresentou aumento significativo no total de mergulhos em comparação ao respectivo salina, e em relação aos grupos SCHO.

Quanto à %TC, o grupo CCHO salina apresentou aumento em relação aos grupos SCHO, e o grupo SCHO MDZ 30,0 apresentou aumento em comparação ao respectivo salina.

Tabela 7. Efeito do tratamento com salina e midazolam (MDZ) intra-COF sobre % Tempo no centro, o total de esticar (SAP), a % SAP protegido, total de mergulhos, % mergulhos protegidos, total de levantamentos e total de imobilidade no LCE em camundongos (CCHO n=7-9; SCHO n=5-6). Os valores representam as médias e o erro padrão da média (M±EPM) dos comportamentos avaliados no LCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo salina, #P < 0,05 comparado aos grupos SCHO, &P < 0,05 comparado ao respectivo MDZ 3,0nmol (ANOVA de duas vias).

Comportamentos	Sem Choque			Com Choque		
	Salina	MDZ 3,0	MDZ 30,0	Salina	MDZ 3,0	MDZ 30,0
%Tempo no Centro	14,9±4,5	19,9±2,3	34,7±7,0*	30,9±6,1#	21,7±2,2	10,6±1,7*
Total de SAP	33,8±2,4	31,6±0,7	29,0±1,1	46,5±2,5#	40,1±2,3	22,7±3,1*#&
%SAP Protegido	90,7±2,2	84,2±2,8	85,3±3,7	89,1±2,2	51,0±5,1*#	24,3±4,3*#&
Total de Mergulhos	24,5±3,1	26,8±2,7	34,8±1,8	28,7±2,3	45,2±3,3*#	63,8±3,3*#&
%Merg. Protegidos	86,0±4,1	77,3±4,4	71,8±2,1	80,6±3,5	51,0±5,1*#	8,5±1,0*#&
Levantamentos	10,5±0,8	11,8±1,6	8,4±0,9	8,6±0,9	7,7±1,1	5,2±0,8#
Imobilidade	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

3.3.6. Efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-ínsula sobre o comportamento de camundongos expostos à CCE, após passarem pelo modelo de TEPT.

As Figura 16 (A, B e C) mostram o efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-ínsula sobre o comportamento de camundongos expostos ao teste na CCE após passarem pelo modelo de TEPT.

Quanto à latência de entrada no lado escuro, a ANOVA de duas vias mostrou significância para os fatores condição ($F_{2,34} = 42,59$, $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,34} = 41,62$, $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 37,52$, $p < 0,05$) (Fig. 16A).

O teste Duncan revelou diminuição significativa da latência nos grupos CCHO MDZ 3,0 e 30,0nmol em comparação ao respectivo salina. Por outro lado, o grupo CCHO salina apresentou aumento significativo da latência em relação aos grupos SCHO.

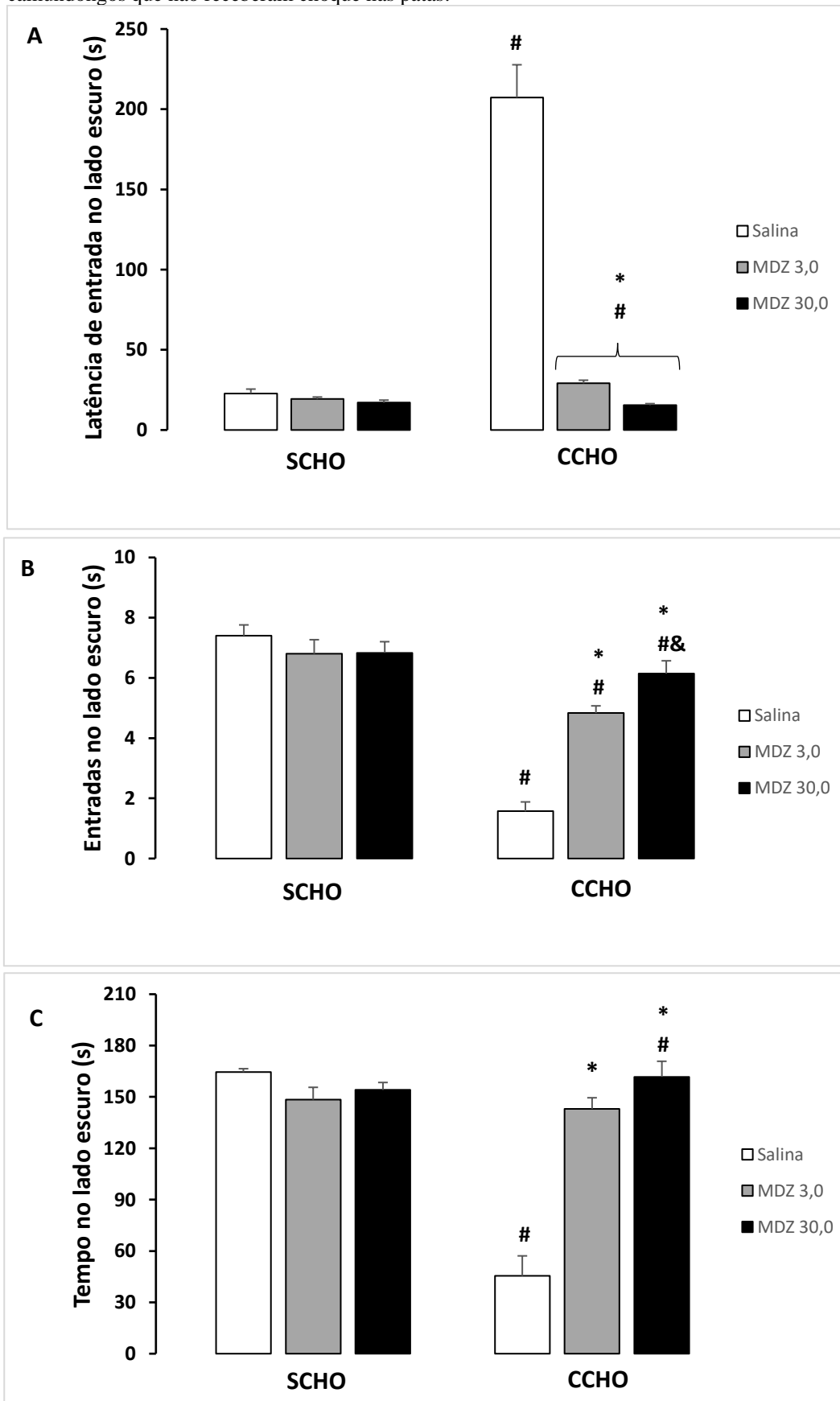
A respeito da taxa de ELE, a ANOVA de duas vias mostra que houve significância para os fatores condição ($F_{2,34} = 52,68$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,34} = 9,38$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 16,03$; $p < 0,05$) (Fig. 16B).

O teste Duncan revelou que houve aumento significativo na taxa de ELE nos grupos CCHO MDZ 3,0 e 30,0nmol em comparação ao respectivo salina, de modo que o grupo CCHO MDZ 30,0 demonstrou um aumento ainda maior em comparação ao respectivo MDZ 3,0nmol. Além disso, o grupo CCHO salina apresentou queda significativa na taxa de ELE em relação aos grupos SCHO.

Já em relação ao TLE, a ANOVA de duas vias mostrou que houve significância nos fatores condição ($F_{2,34} = 21,79$, $p < 0,05$), tratamento ($F_{2,34} = 15,01$; $p < 0,05$) e interação condição e tratamento ($F_{2,34} = 23,44$; $p < 0,05$) (Fig. 16C).

O teste Duncan revelou aumento significativo do TLE nos grupos CCHO MDZ 3,0 e 30,0nmol em relação ao respectivo salina. Por sua vez, o grupo CCHO salina apresentou diminuição significativa no TLE em relação aos grupos SCHO.

Figura 16. Efeito do tratamento com salina e midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-ínsula sobre a (A) latência de entrada, (B) número de entradas no lado escuro (ELE), (C) tempo no lado escuro (ELE) da CCE em camundongos (CCHO n=7-9; SCHO n=5-6). As colunas representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do ELE da caixa CCE. *P < 0,05 comparado ao respectivo salina. #P < 0,05 comparado aos grupos SCHO (ANOVA de duas vias). CCHO = camundongos que receberam choque nas patas; SCHO = camundongos que não receberam choque nas patas.



4. DISCUSSÃO

4.1. Análise geral dos resultados

Os nossos resultados demonstraram que a aplicação de CoCl_2 intra-CCA/Cg2 nos animais SCHO e CCHO aumentou a porcentagem do número de entradas (%EBA) e do tempo gasto nos braços abertos (%TBA), além de ter diminuído os comportamentos de avaliação de risco (%Tempo no centro, %SAP protegido e %Mergulho protegido) e o número de entradas nos braços fechados (EBF) do labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, a aplicação de CoCl_2 intra-CCA/Cg2 nos animais CCHO aumentou o número de entradas e o tempo de permanência no lado escuro da caixa claro-escuro (CCE), e diminuiu a latência de entrada para o lado escuro da caixa (Experimento 1). O midazolam (MDZ, 3,0 e 30,0 nmol) intra-CCA/Cg2 não alterou as medidas de avaliação de ansiedade e de imobilidade no LCE, nos dois grupos, SCHO e CCHO. Entretanto, na CCE, midazolam na dose de 30,0 nmol, aumentou o número de entradas e o tempo de permanência no lado escuro da caixa. O midazolam produziu efeitos opostos para a latência de entrada para o lado escuro da caixa, enquanto a menor dose aumentou, a maior dose diminuiu a avaliação deste comportamento na CCE. Cabe salientar que o grupo salina CCHO, apresentou aumento dos comportamentos relacionados a lembrança do evento aversivo (choque nas patas), 34 dias antes da reexposição a CCE, quando comparado ao grupo SCHO (Experimento 2).

A aplicação de CoCl_2 intra-COF aumentou %EBA e a %TBA nos braços abertos, e diminuiu os comportamentos de avaliação de risco (%SAP protegido e %Mergulho protegido), sem alterar a atividade locomotora (EBF) no labirinto em cruz elevado (LCE), somente no grupo CCHO. O tratamento com CoCl_2 intra-COF induziu diminuição na latência para entrada no lado escuro da caixa, aumentou o número de entradas (ELE) e o

tempo de permanência (TLE) no lado escuro da CCE nos camundongos expostos ao estímulo aversivo (CCHO) e avaliados na caixa claro-escuro (CCE) (Experimento 3). O tratamento com as duas doses de midazolam (3,0 e 30,0 nmol) intra-COF, aumentou a exploração nos braços abertos (%EBA e %TBA) do labirinto e intensificou os comportamentos relacionados à memória aversiva (aumentou a latência, diminuiu ELE e o TLE) no grupo CCHO, em relação aos respectivos salina e MDZ 3,0 nmol. Cabe salientar que o grupo salina CCHO, apresentou aumento dos comportamentos relacionados a lembrança do evento aversivo (choque nas patas), 34 dias antes da reexposição a CCE, quando comparado ao grupo SCHO (Experimento 4).

No Experimento 5, a aplicação intra-ínsula de CoCl_2 aumentou a exploração dos abertos do LCE (%EBA e %TBA), e diminuiu as entradas nos braços fechados, sem alterar a imobilidade no grupo CCHO, comparado ao respectivo salina SCHO. A inibição reversível com CoCl_2 intra-ínsula diminuiu a latência de entrada e aumentou a exploração do lado escuro no grupo CCHO em comparação ao respectivo salina. A exploração do lado escuro da CCE no grupo CCHO salina foi significativa menor em comparação aos grupos SCHO. O tratamento com as duas doses de midazolam (3,0 e 30 nmol) intra-ínsula induziu aumento da exploração dos braços abertos do LCE (%EBA e %TBA) no CCHO. O efeito ansiolítico não foi observado apenas no grupo com choque, a dose de 30 nmol produziu aumento da %EBA, e as duas doses (3,0 e 30 nmol) produziram aumento da %TBA no grupo que não recebeu choque (SCHO). Os efeitos ansiolíticos foram observados sem alteração da atividade locomotora (EBF), nos dois grupos, SCHO e CCHO. O tratamento com as duas doses de midazolam (3,0 e 30,0) intra-ínsula, diminuiram a latência para entrada no lado escuro, aumentaram as ELE e o TLE no grupo CCHO, sem alterar os comportamentos no grupo SCHO. Cabe salientar que o grupo salina CCHO, apresentou aumento dos comportamentos relacionados a lembrança do

evento aversivo (choque nas patas), 34 dias antes da reexposição a CCE, quando comparado ao grupo SCHO (Experimento 6).

Em relação ao modelo apresentado, os nossos resultados atenderam parcialmente as hipóteses formuladas. Desta forma, foi possível demonstrar que após 34 dias da exposição ao evento aversivo (choque nas patas), os camundongos ainda apresentam apresentando lembrança do estímulo, evitando entrar no lado escuro da CCE. Este efeito do modelo foi registrado após a aplicação de salina nas três estruturas investigadas, intra-CCA, Intra-COF e intra-Ínsula. Este resultado confirma os efeitos observados anteriormente com administração sistêmica de salina (Costa & Canto-de-Souza, 2008) e sem administração de substâncias (Blanco, Souza, Canto-de-Souza, 2017) em camundongos machos.

A inibição reversiva dos canais de cálcio com CoCl_2 intra-CCA, intra-COF e intra-Ínsula, demonstrou que as estruturas participam da modulação das respostas aversivas, no caso específico em relação ao estímulo apresentado (choque nas patas), avaliado em um aparato diferente daquele em que o camundongo recebeu o choque, no caso o labirinto em cruz elevado e na CCE. No modelo utilizado, esses resultados tipo ansiolíticos, são inéditos. Desta forma, consideramos que nossa hipótese foi confirmada.

A nossa hipótese é que a inibição reversível dos neurotransmissores que dependem do armazenamento em vesículas, está envolvida na modulação das respostas e memórias aversivas, e que uma dessas neurotransmissões é a GABAérgica. Os nossos resultados demonstraram que a ativação dos receptores GABAA intra-CCA, intensificaram a memória aversiva (CCE). Outras neurotransmissões, provavelmente devem estar participando da modulação dos estímulos aversivos no CCA. Entretanto, a ativação GABAérgica intra-COF e intra-ínsula, reverteu o efeito aversivo do choque nos

camundongos expostos aos dois aparatos, LCE e CCE. Portanto, nossa hipótese foi parcialmente confirmada.

Porém, antes mesmo de levantarmos novas hipóteses, cabe aqui analisar os dados de cada uma das três estruturas por nós investigadas.

4.2. Córtex Cingulado Anterior (CCA)

Quanto aos resultados sobre comportamentos do tipo ansiedade no LCE, nossos dados sobre o CCA corroboram com estudos com humanos que observaram ativação significativa (aumento do fluxo sanguíneo) da região dorsal dessa estrutura em diferentes estados de ansiedade. Robinson et al. (2014), por exemplo, observaram que pacientes diagnosticados com transtorno de ansiedade generalizada e/ou ansiedade social (não medicados), durante a realização de uma tarefa de classificação facial (faces felizes vs com medo), demonstraram atividade significativa no córtex cingulado anterior dorsal positivamente associada com significativa ativação amigdalár durante a apresentação de faces com medo. O que vai ao encontro das proposições de Vogt (2005) e Milad et al. (2007, 2009) de que o CCA dorsal é ativado por estímulos que induzem medo.

Já quanto a roedores, Tanaka et al. (2019) a partir de um protocolo de TEPT com camundongos consistindo em uma única sessão de choques ($1,5 \text{ mA} \times 2 \text{ s} \times 8 \text{ vezes}$) seguido de 2 a 4 situações de lembrança semanais, observaram que os animais, 2 semanas após condicionamento, demonstraram comportamentos do tipo ansiedade no LCE e resposta exagerada de sobressalto após 4 semanas, o que foi correlacionado com crescente desregulação gênica no CCA. Desse modo, é possível que a inibição da atividade do Cg2 de camundongos tenha diminuído significativamente a avaliação de risco e de processamento de estimulação aversiva, o que explicaria, por exemplo, o aumento significativo da exploração dos braços abertos em detrimento do número de entradas e de tempo de exploração nos braços fechados. Cabe ressaltar que apesar dos resultados

mostrarem diminuição das entradas nos braços fechados do LCE, este efeito não foi devido ao aumento de imobilidade porque não houve alteração significativa nesse comportamento.

Por outro lado, a administração de midazolam (MDZ) tanto no CCA não demonstrou efeito significativo nos comportamentos do tipo ansiedade no LCE. A respeito do CCA, isso pode ser devido ao fato de que as neurotransmissões GABA_A-benzodiazepínicas no Cg2 dependam de informação mnemônica prévia. Como observado por Albrechet-Souza, Borelli, Carvalho e Brandão (2009), ratos que receberam injeção intraperitoneal de midazolam previamente à primeira exposição ao LCE, apresentaram aumento da exploração dos braços abertos, resultado que foi correlacionado com a diminuição significativa de Fos apenas na área Cg1 do CCA. Entretanto, quando aplicado previamente ao reteste no LCE, houve diminuição significativa da expressão de Fos no Cg2 juntamente com outras estruturas, incluindo o Cg1. Desse modo, é possível que as neurotransmissões GABA_A-benzodiazepínicas no Cg2 tenham um papel relacionado à memória.

Indo nessa direção, nossos resultados obtidos nos testes na CCE mostraram que a administração de CoCl₂ intra-CCA resultou em efeito do tipo ansiolítico, ou seja, aumentou a exploração do lado escuro que, anteriormente, tinha sido associado com choque nas patas.

Estudos com humanos têm mostrado que o CCA dorsal está positivamente correlacionado com diferença na resposta galvânica da pele diante a estímulos aversivos (Milad et al., 2007). Resultado semelhante de ativação do CCA dorsal foi observado em pacientes com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) quando comparados com participantes que passaram por evento traumático sem desenvolverem TEPT. Nesse estudo, foi observado que em pessoas com TEPT a ativação do CCA dorsal se manteve

diante à apresentação do estímulo aversivamente condicionado (CS+) mesmo após passar por extinção (Milad et al., 2009). Indo na mesma direção, Straube et al. (2009), utilizando um protocolo com diferentes intensidades de choque nos dedos das mãos, observaram que os participantes demonstravam maior ativação do CCA dorsal para estímulos da categoria “dor forte, mas tolerável”, demonstrando a possibilidade de que a dinâmica neural do CCA depende do valor de ameaça do estímulo.

Dados similares também foram encontrados com primatas não-humanos. Klavir, Genud-Gabai e Paz (2012), a partir de um estudo em que estímulos visuais e auditivos (CS+) foram condicionados com sofrimento de ar nos olhos em *Macaca fascicularis*, propuseram que o CCA dorsal desses animais é uma das estruturas responsáveis pelo armazenamento e expressão da memória aversiva para ambos CS+.

Já quanto aos experimentos com roedores, nossos dados na CCE corroboram com importantes achados sobre o papel do CCA na modulação da memória aversiva. Frankland, Bontempi, Talton, Kaczmarek e Silva (2004), a partir de um protocolo baseado em três choques não sinalizados nas patas de camundongos, onde os animais foram reexpostos ao contexto condicionado 1, 3, 18 ou 36 dias após o treino, observaram que os animais com α -proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II mutante (α -CaMKII^{-/+}) demonstraram queda significativa na expressão de c-Fos no CCA, o que resultou no déficit da retenção da memória aversiva ligada ao contexto nesses animais. Além disso, foi observado aumento significativo da expressão de Zif268 no CCA dos camundongos após o teste remoto (18 ou 36 dias após o condicionamento), e, uma vez que essa proteína tem sido associada à ativação neural relacionada à neuroplasticidade (Knapska e Kaczmarek, 2004), a expressão de Zif268 no CCA pode estar associada com o armazenamento de memória aversiva de longo prazo. Para reforçar os resultados observados, os pesquisadores realizaram inativação do CCA dos animais com lidocaína

antes das reexposições. Os resultados mostraram que a inativação do CCA só foi significativa apenas 18 e 36 dias após o condicionamento, sugerindo, juntamente com os demais dados, um papel significativo do CCA na memória aversiva de longo prazo (remota).

Além disso, Bian et al. (2019) observaram um papel significativo do CCA também na generalização da memória de medo a contextos distintos, porém semelhantes com o contexto previamente condicionado. Uma vez que sobregeneralização é um dos sintomas característicos do TEPT, os experimentadores submeteram camundongos ao condicionamento aversivo com choque nas patas em uma caixa de condicionamento comum (com som branco tocando durante o condicionamento) no primeiro dia do teste (caixa-treino). No dia 1 ou 14 após o treino, os camundongos foram expostos na caixa-treino ou em uma caixa idêntica a do treino mas modificada (caixa-nova), apresentando algumas características sensoriais distintas tais como, sem som, com furos em uma das paredes e o assoalho plano pintado de marrom, substituindo as grades de choque, onde a taxa de imobilidade foi mensurada. Os resultados mostraram que a taxa de imobilidade no 1º dia (após o treino) só foi efetiva na caixa-treino. Porém, no 14º dia não houve diferença significativa entre a taxa de imobilidade observada na caixa-nova quando comparada a caixa-treino. Além disso, em correlação com essa modulação comportamental de longo prazo, os autores observaram aumento da expressão de c-Fos no CCA de camundongos expostos a caixa-nova, mas somente no 14º dia após o treino. Após o uso de técnicas optogenéticas, também foi confirmado que a inativação do CCA impediu a expressão de medo generalizado.

Desse modo, levando em consideração os resultados apresentados acima, é possível sugerir que o papel do CCA/Cg2 esteja relacionado à modulação do comportamento com base em informação mnemônica de longo prazo. Isso pode inclusive

explicar por que a inibição do CCA/Cg2 com o CoCl_2 e o midazolam 30,0 nmol produziram reversão da memória aversiva de longo prazo avaliada na CCE.

4.3. Córtex orbitofrontal (COF)

Nossos dados sobre a exploração do LCE após a aplicação de CoCl_2 de MDZ intra-COF estão de acordo com outros trabalhos sobre lesões em primatas não-humanos e roedores. Tanto Izquierdo et al. (2004) quanto Khalin et al. (2007) observaram que lesões no COF de macacos Rhesus diminuíram significativamente a reação de medo inato por cobras. Além disso, Morgan e LeDoux (1999), através de lesão eletrolítica bilateral no COF de ratos Sprague-Dawley machos, observaram que, após condicionamento aversivo por contexto (choque de 0,5 mA por 500 ms), os animais lesionados apresentaram diminuição significativa da imobilidade em comparação ao controle no segundo e terceiro dias após o condicionamento. Da mesma forma, Costanzi et al. (2014) observaram que camundongos C57BL/6N machos que sofreram lesão bilateral com ácido ibotênico no COF lateral, após passarem por um modelo de TEPT (choque de 0,7 mA ou 1,5 mA por 2 s), apresentaram diminuição de imobilidade na expressão de medo condicionado ao contexto e aumento da exploração dos braços abertos do LCE. Efeito ansiolítico semelhante foi observado em ratos avaliados no LCE com lesão induzida por ácido ibotênico injetado no córtex pré-frontal medial, incluindo COF (Shah & Treit, 2003).

Já a respeito da CCE, nossos dados sobre a aplicação de CoCl_2 corrobora com outros estudo que indicam participação do COF na expressão da memória aversiva. Além dos dados sobre expressão de medo já mencionados acima, pacientes com TEPT têm demonstrado menor volume da matéria cinzenta no COF (Kunimatsu et al., 2019). Chang, Liu e Chang (2018), a partir de um protocolo de ativação dos receptores N-metil-D-

aspartato (NMDA) no COF lateral de ratos, observaram que tal ativação antes do aprendizado da extinção dificultou a codificação da extinção resultado em respostas sobreaversivas. Assim sendo, é possível que a inativação dessa região com CoCl_2 tenha impedido a ativação dos receptores NMDA no dia do teste (exposição ao contexto aversivo).

Já quanto à aplicação de MDZ intra-COF evidenciou um resultado que não esperávamos, ou seja, enquanto a dose de 3,0nmol no grupo CCHO não tenha resultado em comportamentos distintos do respectivo grupo salina, a dose de 30,0nmol intensificou a reação aversiva nos animais deste grupo. Recentemente, Vogt e colaboradores (2021) publicaram um estudo em humanos onde detectaram que a aplicação de quetamina, que também é um agonista benzodiazepínico-GABA_A (Irifune et al., 2000), antes de uma tarefa cognitiva ligada a resposta a estímulos aversivos, aumentou o nível de processamento cognitivo no córtex orbitofrontal. Dessa forma, é possível que a aplicação de MDZ na dose de 30,0nmol no COF, durante o modelo de TEPT por nós utilizado, aumente a aversão ligada à tomada de decisão.

4.4. Ínsula

Já quanto à ínsula, aqui é importante destacar que, mais recentemente, esta estrutura tem sido associada ao que é chamado de predições interoceptivas ao invés de processamento emocional em si (Barrett & Simmons, 2015; Quigley et al., 2021; Fermin et al., 2022, 2023), uma vez que foi demonstrado que, mesmo diante de lesão bilateral da ínsula, ainda persiste o processamento emocional e sensação de “eu” (*self*) em humanos (Damasio, Damasio & Tranel, 2013). Ou seja, de acordo com os novos modelos teóricos, a ínsula está associada no processamento de predições sobre as reações interoceptivas associadas a determinados contextos e situações em que o indivíduo se encontra ou irá se

encontrar. Dessa forma, o fato de a inativação da ínsula estar associada com comportamentos do tipo ansiolítico em roedores (Méndez-Ruette et al., 2019; Benassi-Cezar et al., 2021), pode ser que, na verdade, essa inativação esteja associada com o bloqueio de predições interoceptivas na ínsula, aumentando, assim, a exploração dos braços abertos do LCE, assim como nos nossos dados acima.

Por exemplo, o estudo de Méndez-Ruette e colaboradores (2019) observaram que, embora a aplicação de bicuculina (um antagonista GABA_A) diminuiu a exploração dos braços abertos em ratos Sprague-Dawley, a inativação dessa estrutura com CNQX (um antagonista AMPA glutamatérgico) apresentou efeito contrário, aumentando a exploração dos braços abertos do LCE. E, indo na mesma direção, o estudo de Benassi-Cesar, Carmona, Baptista-de-Souza, Nunes-de-Souza e Canto-de-Souza (2021) mostrou que a aplicação de CoCl₂ intra-ínsula aumentou a exploração dos braços abertos no LCE em animais que conviveram com parceiros em dor crônica. Resultado que foi replicado no nosso estudo.

Por sua vez, nossos dados da CCE vão ao encontro de outros estudos sobre a participação da ínsula na modulação da memória aversiva em animais não-humanos (ou, de acordo com os novos modelos teóricos, predições interoceptivas ligadas a situações condicionadas aversivamente). Por exemplo, Foilb, Flyer-Adams, Maier e Christianson (2016) observaram que a aplicação de muscimol (agonista GABA_A) diminuiu significativamente o congelamento em ratos Sprague-Dawley que passaram por pareamento aversivo (som + choque). Resultado semelhante foi observado por Rodríguez e colaboradores (2020) utilizando ratos Sprague-Dawley expostos ao condicionamento por odor de predador (gatos). E, ainda mais próximo do nosso estudo, foi demonstrado que camundongos que passaram por exposição única de restrição (2h) e nado forçado (20 min) (modelo de TEPT) e, que posteriormente passaram por pareamento aversivo de som

com choque, foi observado, através de optogenética, que a ínsula anterior (que foi a área estudada por nós acima) é a maior fonte de projeções para a amígdala no processamento de comportamento aversivamente condicionado em comparação à ínsula posterior (Shi, Feng, Wei & Zhou, 2020).

4.5. Limitações e perspectivas futuras

Dessa forma, como descrito acima, confirmamos que a inibição não seletiva dessas estruturas induziu a comportamentos do tipo ansiolítico nas estruturas-alvo. A neurotransmissão GABAérgica do COF e da Ínsula participam do controle emocional associado a resposta aversiva investigada. Entretanto, a ausência de efeito no CCA, sugere que outras neurotransmissões, além da GABAérgica, estejam envolvidas na modulação desses comportamentos. Investigar outras neurotransmissões que possam participar dessas respostas, é uma das possibilidades evidenciadas com este trabalho.

Portanto, em estudos futuros seria interessante investigar quais as projeções neurais dessas estruturas (COF e Ínsula) a partir de optogenética ou técnicas similares, assim como feito por Foilb, Flyer-Adams, Maier e Christianson (2016), que observaram maior concentração de projeções da ínsula anterior para a amígdala em camundongos expostos a um modelo de TEPT.

Já sobre o quadro clínico do TEPT, a intrusão é a principal característica que fez com que esse distúrbio tenha ganhado uma categoria própria no DSM5. No entanto, isso não é algo passível de investigação em roedores, por envolver relato de experiência subjetiva. Talvez, uma forma de contornar esse problema possa ser solucionado, selecionando camundongos mais sensíveis a eventos aversivos, sendo mais compatíveis com o TEPT humano, onde apenas cerca de 3-5% da população desenvolve essa doença. Dessa forma, estudos que selecionam apenas roedores que demonstram comportamento

“sobreaversivo” e com efeitos comportamentais por mais tempo, teriam, assim, grupos de sujeitos mais próximo da realidade clínica humana. Logicamente, nessas condições, o número de roedores utilizados nas investigações deve ser maior, e, portanto, o estudo teria de delimitar o número de estruturas e neurotransmissões investigadas.

Além disso, será interessante que outras pesquisas investiguem as diferentes fases da memória que possam estar envolvidas no TEPT. Por exemplo, avaliar as etapas de codificação, com aplicação de fármacos antes da primeira exposição à CCE, ou mesmo em relação à consolidação, com aplicação de fármacos logo após à exposição ao choque. Estudos que podem complementar os resultados obtidos com este trabalho.

De modo geral, é possível que os dados aqui apresentados deem origem a novos estudos de forma que se possa compreender melhor a neurobiologia e as neurotransmissões envolvidas no TEPT.

5. CONCLUSÃO

O nosso trabalho mostrou que o modelo utilizado de TEPT, apresentou resultados interessantes, demonstrando que o estímulo aversivo (choque nas patas) promove aumento de ansiedade, principalmente em camundongos expostos na CCE.

A aplicação de CoCl_2 nas três estruturas, CCA, COF e ínsula, induziu efeitos do tipo ansiolíticos em camundongos avaliados no LCE e na CCE.

O tratamento com midazolam intra-Ínsula, produziu efeitos do tipo ansiolítico nos dois aparatos utilizados (LCE e CCE). A aplicação intra-COF, produziu efeito do tipo ansiogênico nos camundongos avaliados na CCE. Entretanto, não alterou os comportamentos avaliados no LCE após aplicação intra-CCA.

Portanto, os dados confirmam a importância do CCA, COF e ínsula (áreas corticais) na participação da modulação das respostas comportamentais do tipo ansiedade e memória aversiva de longo prazo a partir de um modelo de TEPT para camundongos.

A neurotransmissão GABAérgica do COF e da Ínsula participam do controle emocional associado a resposta aversiva investigada. Entretanto, a ausência de efeito no CCA, sugere que outras neurotransmissões, além da GABAérgica, estejam envolvidas na modulação desses comportamentos.

6. REFERÊNCIAS

- Adamec, R., Fougere, D., & Risbrough, V. (2010). CRF receptor blockade prevents initiation and consolidation of stress effects on affect in the predator stress model of PTSD. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *13*(06), 747–757. <https://doi.org/10.1017/S1461145709990496>
- Albrechet-Souza, L., Borelli, K. G., Carvalho, M. C., & Brandão, M. L. (2009). The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. *Neuroscience*, *164*(2), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.038>
- Andero, R., Brothers, S. P., Jovanovic, T., Chen, Y. T., Salah-Uddin, H., Cameron, M., ... & Binder, E. B. (2013). Amygdala-dependent fear is regulated by Oprl1 in mice and humans with PTSD. *Science translational medicine*, *5*(188), 188ra73-188ra73.
- Baddeley, A. (2007). *Working Memory, Thought, and Action*. Oxford: Oxford University Press.
- Baker, H. M., Barry, T. J., Kumari, V., Pandey, R., Shanta, N., & Lau, J. Y. (2019). Problematic attention processing and fear learning in adolescent anxiety: Testing a combined cognitive and learning processes model. *Journal of behavior therapy and experimental psychiatry*, *62*, 146-153.
- Baptista, D., Bussadori, K., Nunes-de-Souza, R.L., & Canto-de-Souza, A. (2009). Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. *Brain Research*, *1294*, 29–37.
- Barbalho, C.A., Nunes-de-Souza, R.L., & Canto-de-Souza, A. (2009). Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist

- and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. *Brain Research*, *1267*, 65–76.
- Barrett, L. F., & Simmons, W. K. (2015). Interoceptive predictions in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(7), 419–429. <https://doi.org/10.1038/nrn3950>
- Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. A. (2020). *Neuroscience: Exploring the brain*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Benassi-Cezar, G., Carmona, I. M., Baptista-de-Souza, D., Nunes-de-Souza, R. L., & Canto-de-Souza, A. (2021). Differential modulation of the anterior cingulate and insular cortices on anxiogenic-like responses induced by empathy for pain. *Neuropharmacology*, *192*, 108413. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108413>
- Berardi, A., Trezza, V., Palmery, M., Trabace, L., Cuomo, V., & Campolongo, P. (2014). An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Frontiers in behavioral neuroscience*, *8*, 142.
- Bian, X.-L., Qin, C., Cai, C.-Y., Zhou, Y., Tao, Y., Lin, Y.-H., ... Zhu, D.-Y. (2019). Anterior Cingulate Cortex to Ventral Hippocampus Circuit Mediates Contextual Fear Generalization. *The Journal of Neuroscience*, *39*(29), 5728–5739. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2739-18.2019>
- Bishop, S.J. (2007). Neurocognitive mechanisms of anxiety: an integrative account. *Trends in Cognitive Sciences*, *11*, 307–316.
- Bishop, S., Duncan, J., Brett, M., & Lawrence, A.D. (2004). Prefrontal cortical function and anxiety: controlling attention to threat-related stimuli. *Nature Neuroscience*, *7*, 184–188.
- Blackmon, K., Barr, W. B., Carlson, C., Devinsky, O., DuBois, J., Pogash, D., Quinn, B. T., Kuzniecky, R., Halgren, E., & Thesen, T. (2011). Structural evidence for

- involvement of a left amygdala-orbitofrontal network in subclinical anxiety. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, *194*(3), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2011.05.007>
- Blanco, M. B., de Souza, R. R., & Canto-de-Souza, A. (2017). Effects of environmental enrichment in a mouse model of posttraumatic stress disorder. *Psychology & Neuroscience*, *10*(2), 225–242. <https://doi.org/10.1037/pne0000081>
- Blaut, A., Paulewicz, B., Szastok, M., Prochwicz, K., & Koster, E. (2013). Are attentional bias and memory bias for negative words causally related? *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, *44*(3), 293-299.
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, *463*, 55– 65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01274-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01274-3).
- Bornhövd, K., Quante, M., Glauche, V., Bromm, B., Weiller, C., & Büchel, C. (2002). Painful stimuli evoke different stimulus-response functions in the amygdala, prefrontal, insula and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study. *Brain*, *125*, 1326–1336.
- Bremner, J. D. (1999). Does stress damage the brain? *Biological Psychiatry*, *45*(7), 797–805. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00009-8)
- Bremner, J. D., Innis, R. B., Southwick, S. M., Staib, L., Zoghbi, S., & Charney, D. S. (2000). Decreased Benzodiazepine Receptor Binding in Prefrontal Cortex in Combat-Related Posttraumatic Stress Disorder. *American Journal of Psychiatry*, *157*(7), 1120–1126. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.7.1120>
- Breuer, J., & Freud, S. (1893-1895/1977). *Estudos sobre a histeria*. Rio de Janeiro: Imago.

- Bullitt, E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *296*, 517–530.
- Careaga, M. B. L., Girardi, C. E. N., & Suchecki, D. (2019). Variability in response to severe stress: Highly reactive rats exhibit changes in fear and anxiety-like behavior related to distinct neuronal co-activation patterns. *Behavioural Brain Research*, *373*, 112078. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112078>
- Carneiro de Oliveira, P. E., Zaniboni, C. R., Carmona, I. M., Fonseca, A. R., & Canto-de-Souza, A. (2017). Preliminary behavioral assessment of cagemates living with conspecifics submitted to chronic restraint stress in mice. *Neuroscience Letters*, *657*, 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.008>
- Chang, Y.-H., Liu, S.-W., & Chang, C. (2018). Pharmacological activation of the lateral orbitofrontal cortex on regulation of learned fear and extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, *148*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.12.011>
- Clark, I. A., Holmes, E. A., Woolrich, M. W., & Mackay, C. E. (2016). Intrusive memories to traumatic footage: the neural basis of their encoding and involuntary recall. *Psychological Medicine*, *46*(3), 505-518.
- Cohen, H., Zohar, J., Matar, M. A., Zeev, K., Loewenthal, U., & Richter-Levin, G. (2004). Setting apart the affected: the use of behavioral criteria in animal models of post traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*, *29*(11), 1962-1970.
- Costanzi, M., Sarauili, D., Cannas, S., D'Allessandro, F., Florenzano, F., Rossi-Arnaud, C., & Cestari, V. (2014). Fear but not fright: Re-evaluating traumatic experience attenuates anxiety-like behaviors after fear conditioning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00279>

- Costa, F.S.M. (2008). *Avaliação do modelo de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) em camundongos machos: efeitos do midazolam, sertralina e ausência de efeito de imipramina*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Brasil.
- Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., & Tomkins, D.M. (1989). Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *32*, 777–785.
- Craig, A. D. (2009). How do you feel — now? The anterior insula and human awareness. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(1), 59–70. <https://doi.org/10.1038/nrn2555>
- Craske, M.G., & Stein, M.B. (2016). Anxiety. *Lancet*, *388*, 3049–3059.
- Crestani, C.C., Alves, F.H., Busnardo, C., Resstel, L.B., & Correa, F.M. (2010). N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. *Neuroscience Research*, *67*, 317–326.
- Crocq, M. A., & Crocq, L. (2000). From shell shock and war neurosis to posttraumatic stress disorder: a history of psychotraumatology. *Dialogues in clinical neuroscience*, *2*(1), 47–55.
- CRUZ, A. P. M., FREI, F. & GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *49*, 171-176, 1994.
- Davis, M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience*, *15*, 353–375.
- Diamond, D. M., Campbell, A. M., Park, C. R., Woodson, J. C., Conrad, C. D., Bachstetter, A. D., & Mervis, R. F. (2006). Influence of predator stress on the consolidation versus retrieval of long-term spatial memory and hippocampal

- spinogenesis. *Hippocampus*, 16(7), 571–576. <https://doi.org/10.1002/hipo.20188>
- Ding, H. K., Teixeira, C. M., & Frankland, P. W. (2008). Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory*, 15(5), 290–293. <https://doi.org/10.1101/lm.905008>
- Dohrenwend, B. P. (2006). The Psychological Risks of Vietnam for U.S. Veterans: A Revisit with New Data and Methods. *Science*, 313(5789), 979–982. <https://doi.org/10.1126/science.1128944>
- Dunsmoor, J. E., & Paz, R. (2015). Fear generalization and anxiety: behavioral and neural mechanisms. *Biological psychiatry*, 78(5), 336–343.
- Etkin, A., & Wager, T.D. (2007). Functional neuroimaging of anxiety: A meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *American Journal of Psychiatry*, 164, 1476–1488.
- Etkin, A., Egner, T., & Kalisch, R. (2011). Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends in Cognitive Sciences*, 15, 85–93.
- Fermin, A. S. R., Friston, K., & Yamawaki, S. (2022). An insula hierarchical network architecture for active interoceptive inference. *Royal Society Open Science*, 9(6), 220226. <https://doi.org/10.1098/rsos.220226>
- Fermin, A. S. R., Sasaoka, T., Maekawa, T., Chan, H.-L., Machizawa, M. G., Okada, G., Okamoto, Y., & Yamawaki, S. (2023). Insula neuroanatomical networks predict interoceptive awareness. *Heliyon*, 9(8), e18307. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18307>
- Flandreau, E. I., & Toth, M. (2017). Animal Models of PTSD: A Critical Review. In E. Vermetten, D. G. Baker, & V. B. Risbrough (Orgs.), *Behavioral Neurobiology of PTSD* (Vol. 38, p. 47–68). Springer International Publishing.

https://doi.org/10.1007/7854_2016_65

- Foib, A. R., Flyer-Adams, J. G., Maier, S. F., & Christianson, J. P. (2016). Posterior insular cortex is necessary for conditioned inhibition of fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, *134*, 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.004>
- Frankland, P. W. (2004). The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. *Science*, *304*(5672), 881–883. <https://doi.org/10.1126/science.1094804>
- Frankland, P. W., Josselyn, S. A., & Köhler, S. (2019). The neurobiological foundation of memory retrieval. *Nature neuroscience*, *22*(10), 1576-1585.
- Gelpin, E., Bonne, O., Peri, T., Brandes, D., & Shalev, A. Y. (1996). Treatment of recent trauma survivors with benzodiazepines: a prospective study. *The Journal of clinical psychiatry*, *57*(9), 390-394.
- Geuze, E., van Berckel, B. N. M., Lammertsma, A. A., Boellaard, R., de Kloet, C. S., Vermetten, E., & Westenberg, H. G. M. (2008). Reduced GABAA benzodiazepine receptor binding in veterans with post-traumatic stress disorder. *Molecular Psychiatry*, *13*(1), 74–83. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002054>
- Gilbertson, M. W., Shenton, M. E., Ciszewski, A., Kasai, K., Lasko, N. B., Orr, S. P., & Pitman, R. K. (2002). Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nature Neuroscience*, *5*(11), 1242–1247. <https://doi.org/10.1038/nn958>
- Gold, A. L., Morey, R. A., & McCarthy, G. (2015). Amygdala–Prefrontal Cortex Functional Connectivity During Threat-Induced Anxiety and Goal Distraction. *Biological Psychiatry*, *77*(4), 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.030>

- Golden, S. A., Covington, H. E., 3rd, Berton, O., & Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature protocols*, 6(8), 1183–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.361>
- Gonzalez, L.E., Andrews, N., File, S.E. (1996). 5-HT1A and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Research*, 732, 145–153.
- Gottfried, J. A., & Dolan, R. J. (2004). Human orbitofrontal cortex mediates extinction learning while accessing conditioned representations of value. *Nature Neuroscience*, 7(10), 1144–1152. <https://doi.org/10.1038/nn1314>
- Graeff, F.G., Silveira, M.C., Nogueira, R.L., Audi, E.A., & Oliveira, R.M. (1993). Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research*, 58, 123–131.
- Guina, J., Rossetter, S. R., DeRHODES, B. J., Nahhas, R. W., & Welton, R. S. (2015). Benzodiazepines for PTSD: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Psychiatric Practice*, 21(4), 281–303.
- Hahn, A., Stein, P., Windischberger, C., Weissenbacher, A., Spindelegger, C., Moser, E., Kasper, S., & Lanzenberger, R. (2011). Reduced resting-state functional connectivity between amygdala and orbitofrontal cortex in social anxiety disorder. *NeuroImage*, 56(3), 881–889. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.02.064>
- Hakamata, Y., Matsuoka, Y., Inagaki, M., Nagamine, M., Hara, E., Imoto, S., Murakami, K., Kim, Y., & Uchitomi, Y. (2007). Structure of orbitofrontal cortex and its longitudinal course in cancer-related post-traumatic stress disorder. *Neuroscience Research*, 59(4), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.08.012>
- Harvey, B. H., Brand, L., Jeeva, Z., & Stein, D. J. (2006). Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and

- restress in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Physiology & Behavior*, 87(5), 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.01.033>
- Heilbronner, S.R., & Hayden, B.Y. (2016). Dorsal anterior cingulate cortex: A bottom-up view. *Annual Review of Neuroscience*, 39, 149–170.
- Hoehn-Saric, R. (1982). Neurotransmitters in anxiety. *Archives of General Psychiatry*, 39, 735–742.
- Iacoviello, B. M., Wu, G., Abend, R., Murrough, J. W., Feder, A., Fruchter, E., ... & Neumeister, A. (2014). Attention bias variability and symptoms of posttraumatic stress disorder. *Journal of Traumatic Stress*, 27(2), 232-239.
- Irifune, M., Sato, T., Kamata, Y., Nishikawa, T., Dohi, T., & Kawahara, M. (2000). Evidence for GABAA Receptor Agonistic Properties of Ketamine: Convulsive and Anesthetic Behavioral Models in Mice: *Anesthesia & Analgesia*, 91(1), 230–236. <https://doi.org/10.1097/00000539-200007000-00043>
- Izquierdo, A. (2005). Comparison of the Effects of Bilateral Orbital Prefrontal Cortex Lesions and Amygdala Lesions on Emotional Responses in Rhesus Monkeys. *Journal of Neuroscience*, 25(37), 8534–8542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1232-05.2005>
- Jackson, P.L., Meltzoff, A.N., & Decety, J. (2005). How do we perceive the pain of others? A window into the neural processes involved in empathy. *Neuroimage*, 24, 771–779.
- Joshi, S. A., Aupperle, R. L., & Khalsa, S. S. (2023). Interoception in Fear Learning and Posttraumatic Stress Disorder. *FOCUS*, 21(3), 266–277. <https://doi.org/10.1176/appi.focus.20230007>
- Kaczurkin, A. N., Burton, P. C., Chazin, S. M., Manbeck, A. B., Espensen-Sturges, T., Cooper, S. E., ... & Lissek, S. (2017). Neural substrates of overgeneralized

- conditioned fear in PTSD. *American Journal of Psychiatry*, 174(2), 125-134.
- Kalin, N. H., Shelton, S. E., & Davidson, R. J. (2007). Role of the Primate Orbitofrontal Cortex in Mediating Anxious Temperament. *Biological Psychiatry*, 62(10), 1134–1139. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.04.004>
- Kalisch, R., & Gerlicher, A.M. (2014). Making a mountain out of a molehill: on the role of the rostral dorsal anterior cingulate and dorsomedial prefrontal cortex in conscious threat appraisal, catastrophizing, and worrying. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 42, 1–8.
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163-186.
- Karam, E. G., Friedman, M. J., Hill, E. D., Kessler, R. C., McLaughlin, K. A., Petukhova, M., Sampson, L., Shahly, V., Angermeyer, M. C., Bromet, E. J., de Girolamo, G., de Graaf, R., Demyttenaere, K., Ferry, F., Florescu, S. E., Haro, J. M., He, Y., Karam, A. N., Kawakami, N., ... Koenen, K. C. (2014). CUMULATIVE TRAUMAS AND RISK THRESHOLDS: 12-MONTH PTSD IN THE WORLD MENTAL HEALTH (WMH) SURVEYS: Cumulative Trauma and PTSD. *Depression and Anxiety*, 31(2), 130–142. <https://doi.org/10.1002/da.22169>
- Kedia, S., & Chattarji, S. (2014). Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 233, 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.06.012>
- Kessler, R. C. (1995). Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey. *Archives of General Psychiatry*, 52(12), 1048. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1995.03950240066012>
- Kessler, R. C., & Wang, P. S. (2008). The Descriptive Epidemiology of Commonly Occurring Mental Disorders in the United States. *Annual Review of Public Health*,

- 29(1), 115–129. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090847>
- Ketenci, S., Acet, N. G., Saridoğan, G. E., Aydın, B., Cabadak, H., & Gören, M. Z. (2020). The Neurochemical Effects of Prazosin Treatment on Fear Circuitry in a Rat Traumatic Stress Model. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 18(2), 219–230. <https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.2.219>
- Kessler, R.C., Petukhova, M., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M., & Wittchen, H.U. (2012). Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, 21, 169–184.
- Klavir, O., Genud-Gabai, R., & Paz, R. (2012). Low-Frequency Stimulation Depresses the Primate Anterior-Cingulate-Cortex and Prevents Spontaneous Recovery of Aversive Memories. *Journal of Neuroscience*, 32(25), 8589–8597. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6481-11.2012>
- Klumpp, H., Ho, S.S., Taylor, S.F., Phan, K.L., Abelson, J.L., & Liberzon, I. (2011). Trait anxiety modulates anterior cingulate activation to threat interference. *Depression and Anxiety*, 28, 194–201.
- Knapska, E., & Kaczmarek, L. (2004). A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Progress in Neurobiology*, 74(4), 183–211. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.05.007>
- Knapska, E., & Maren, S. (2009). Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learning & Memory*, 16, 486–493.
- Kok, B. C., Herrell, R. K., Thomas, J. L., & Hoge, C. W. (2012). Posttraumatic stress disorder associated with combat service in Iraq or Afghanistan: reconciling

- prevalence differences between studies. *The Journal of nervous and mental disease*, 200(5), 444-450.
- Kretz, R. (1984). Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 129–135.
- Kuniishi, H., Ichisaka, S., Matsuda, S., Futora, E., Harada, R., & Hata, Y. (2017). Chronic inactivation of the orbitofrontal cortex increases anxiety-like behavior and impulsive aggression, but decreases depression-like behavior in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 10, 250.
- Kunimatsu, A., Yasaka, K., Akai, H., Kunimatsu, N., & Abe, O. (2020). MRI findings in posttraumatic stress disorder. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 52(2), 380–396. <https://doi.org/10.1002/jmri.26929>
- Lanius, R. A., Vermetten, E., Loewenstein, R. J., Brand, B., Schmahl, C., Bremner, J. D., & Spiegel, D. (2010). Emotion Modulation in PTSD: Clinical and Neurobiological Evidence for a Dissociative Subtype. *American Journal of Psychiatry*, 167(6), 640–647. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09081168>
- Laubach, M., Amarante, L. M., Swanson, K., & White, S. R. (2018). What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *Eneuro*, 5(5), ENEURO.0315-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0315-18.2018>
- Leroy, A., Very, E., Birmes, P., Yger, P., Szaffarczyk, S., Lopes, R., Outteryck, O., Faure, C., Duhem, S., Grandgenèvre, P., Warembourg, F., Vaiva, G., & Jardri, R. (2022). Intrusive experiences in posttraumatic stress disorder: Treatment response induces changes in the directed functional connectivity of the anterior insula. *NeuroImage: Clinical*, 34, 102964. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2022.102964>
- Liberzon, I., Taylor, S. F., Phan, K. L., Britton, J. C., Fig, L. M., Bueller, J. A., Koeppe, R. A., & Zubieta, J.-K. (2007). Altered Central μ -Opioid Receptor Binding After

Psychological Trauma. *Biological Psychiatry*, 61(9), 1030–1038.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.06.021>

Lindner, P., Flodin, P., Larm, P., Budhiraja, M., Savic-Berglund, I., Jokinen, J., Tiihonen, J., & Hodgins, S. (2018). Amygdala-orbitofrontal structural and functional connectivity in females with anxiety disorders, with and without a history of conduct disorder. *Scientific Reports*, 8(1), 1101. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19569-7>

Lister, R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92, 180–185.

Lu, W.L., Zhang, Q., Zheng, L., Wang, H., Li, R.Y., Zhang, L.F., et al. (2004). Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen beta-cyclodextrin inclusion complexes in animals. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1515–1520.

Marmar, C. R., Schlenger, W., Henn-Haase, C., Qian, M., Purchia, E., Li, M., Corry, N., Williams, C. S., Ho, C.-L., Horesh, D., Karstoft, K.-I., Shalev, A., & Kulka, R. A. (2015). Course of Posttraumatic Stress Disorder 40 Years After the Vietnam War: Findings From the National Vietnam Veterans Longitudinal Study. *JAMA Psychiatry*, 72(9), 875. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.0803>

Matsuo, K., Taneichi, K., Matsumoto, A., Ohtani, T., Yamasue, H., Sakano, Y. et al. (2003). Hypoactivation of the prefrontal cortex during verbal fluency test in PTSD: a near-infrared spectroscopy study. *Psychiatry Research*, 124, 1–10.

Méndez-Ruette, M., Linsam Barth, S., Moraga-Amaro, R., Quintana-Donoso, D., Méndez, L., Tamburini, G., Cornejo, F., Torres, R. F., & Stehberg, J. (2019). The Role of the Rodent Insula in Anxiety. *Frontiers in Physiology*, 10, 330. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00330>

- McCarberg, B., & Peppin, J. (2019). Pain Pathways and nervous system plasticity: learning and memory in pain. *Pain Medicine*, *20*(12), 2421-2437.
- Neugebauer, V. (2015). Amygdala pain mechanisms. In *Pain Control* (pp. 261-284). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Miao, Y.-L., Guo, W.-Z., Shi, W.-Z., Fang, W.-W., Liu, Y., Liu, J., Li, B.-W., Wu, W., & Li, Y.-F. (2014). Midazolam Ameliorates the Behavior Deficits of a Rat Posttraumatic Stress Disorder Model through Dual 18 kDa Translocator Protein and Central Benzodiazepine Receptor and Neurosteroidogenesis. *PLoS ONE*, *9*(7), e101450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101450>
- Milad, M.R., & Quirk, G.J. (2002). Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, *420*, 70–74.
- Milad, M. R., & Rauch, S. L. (2007). The Role of the Orbitofrontal Cortex in Anxiety Disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1121*(1), 546–561. <https://doi.org/10.1196/annals.1401.006>
- Milad, M. R., Pitman, R. K., Ellis, C. B., Gold, A. L., Shin, L. M., Lasko, N. B., ... Rauch, S. L. (2009). Neurobiological Basis of Failure to Recall Extinction Memory in Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*, *66*(12), 1075–1082. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.06.026>
- Milad, M. R., Quirk, G. J., Pitman, R. K., Orr, S. P., Fischl, B., & Rauch, S. L. (2007). A Role for the Human Dorsal Anterior Cingulate Cortex in Fear Expression. *Biological Psychiatry*, *62*(10), 1191–1194. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.04.032>
- Monosov, I.L. (2017). Anterior cingulate is a source of valence-specific information about value and uncertainty. *Nature Communications*, *8*, 134.
- Moore, N. L. T., Gauchan, S., & Genovese, R. F. (2012). Differential severity of

- anxiogenic effects resulting from a brief swim or underwater trauma in adolescent male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 102(2), 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.05.002>
- Morris, J. S., & Dolan, R. J. (2004). Dissociable amygdala and orbitofrontal responses during reversal fear conditioning. *NeuroImage*, 22(1), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.01.012>
- Murrough, J. W., Huang, Y., Hu, J., Henry, S., Williams, W., Gallezot, J.-D., Bailey, C. R., Krystal, J. H., Carson, R. E., & Neumeister, A. (2011). Reduced Amygdala Serotonin Transporter Binding in Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry*, 70(11), 1033–1038. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.003>
- Myers, C. (1915). A contribution to the study of shell shock.: Being an account of three cases of loss of memory, vision, smell, and taste, admitted into the Duchess of Westminster's War Hospital, Le Touquet. *The Lancet*, 185(4772), 316-320.
- Neumeister, A., Seidel, J., Ragen, B. J., & Pietrzak, R. H. (2015). Translational evidence for a role of endocannabinoids in the etiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 577–584.
- Nunes-de-Souza, R.L., Canto-de-Souza, A., da-Costa, M., Fornari, R.V., Graeff, F.G., & Pelá, I.R. (2000). Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology (Berlin)*, 150, 300–310.
- Nuss, P. (2015). Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 165–175.
- Olkkola, K. T., & Ahonen, J. (2008). Midazolam and Other Benzodiazepines. In J. Schüttler & H. Schwilden (Orgs.), *Modern Anesthetics* (Vol. 182, p. 335–360). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74806-9_16

- Park, J., Wood, J., Bondi, C., Del Arco, A., & Moghaddam, B. (2016). Anxiety evokes hypofrontality and disrupts rule-relevant encoding by dorsomedial prefrontal cortex neurons. *Journal of Neuroscience*, *36*, 3322–3335.
- Park, S., Cho, J., & Huh, Y. (2022). Role of the anterior insular cortex in restraint-stress induced fear behaviors. *Scientific Reports*, *12*(1), 6504. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10345-2>
- Phelps, E.A., Delgado, M.R., Nearing, K.I., & LeDoux, J.E. (2004). Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. *Neuron*, *43*, 897–905.
- Paulus, M.P., & Stein, M.B. (2006). An insular view of anxiety. *Biological Psychiatry*, *60*, 383–387.
- Pitman, R.K., Rasmusson, A. M., Koenen, K.C., Shin, L.M., Orr, S.P., Gilbertson, M.W., et al. (2012). Biological Studies of Posttraumatic Stress Disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*, 769–787.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, *463*, 3–33.
- Pulliam, J. V. K., Dawaghereh, A. M., Alema-Mensah, E., & Plotsky, P. M. (2010). Social defeat stress produces prolonged alterations in acoustic startle and body weight gain in male Long Evans rats. *Journal of Psychiatric Research*, *44*(2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.05.005>
- Pynoos, R.S., Ritzmann, R.F., Steinberg, A.M., Goenjian, A., & Prisecaru, I. (1996). A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. *Biological Psychiatry*, *39*, 129–134.
- Quigley, K. S., Kanoski, S., Grill, W. M., Barrett, L. F., & Tsakiris, M. (2021). Functions of Interoception: From Energy Regulation to Experience of the Self. *Trends in*

Neurosciences, 44(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.09.008>

- Reis, L.M., & Canto-de-Souza, A. (2009). Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. *Brain Research*, 1231, 93–102.
- Resstel, L. B., Joca, S. R., Guimarães, F. G. & Corrêa, F. M. (2006). Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience*, 43, 377-85.
- Resstel L. B., Souza R. F. & Guimarães F. S. (2008). Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. *Physiology Behavior*, 93, 200-5.
- Revlin, R. (2012). *Cognition: Theory and Practice*. New York: Worth Publishers.
- Richter-Levin, G. (1998). Acute and long-term behavioral correlates of underwater trauma—Potential relevance to stress and post-stress syndromes. *Psychiatry Research*, 79(1), 73–83. [https://doi.org/10.1016/S0165-1781\(98\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1781(98)00030-4)
- Richter-Levin, G., Stork, O., & Schmidt, M. V. (2019). Animal models of PTSD: A challenge to be met. *Molecular Psychiatry*, 24(8), 1135–1156. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0272-5>
- Ritov, G., Boltyansky, B., & Richter-Levin, G. (2016). A novel approach to PTSD modeling in rats reveals alternating patterns of limbic activity in different types of stress reaction. *Molecular Psychiatry*, 21(5), 630–641. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.169>
- Robinson, O. J., Krinsky, M., Lieberman, L., Allen, P., Vytal, K., & Grillon, C. (2014). The dorsal medial prefrontal (anterior cingulate) cortex–amygdala aversive amplification circuit in unmedicated generalised and social anxiety disorders: An observational study. *The Lancet Psychiatry*, 1(4), 294–302.

[https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(14\)70305-0](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(14)70305-0)

- Rodgers, R.J.; Johnson, N.J.T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry e Behavior*, 52, 297-303,
- Rodríguez, M., Ceric, F., Murgas, P., Harland, B., Torrealba, F., & Contreras, M. (2020). Interoceptive Insular Cortex Mediates Both Innate Fear and Contextual Threat Conditioning to Predator Odor. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 283. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00283>
- Sah, P., Westbrook, R. F., & Lüthi, A. (2008). Fear conditioning and long-term potentiation in the amygdala: what really is the connection? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129(1), 88-95.
- Shah, A. A., & Treit, D. (2003). Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Research*, 969(1-2), 183-194. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02299-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02299-6)
- Sherin, J.E., & Nemeroff, C.B. (2011). Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13, 263-278.
- Sherwood, L. (2016). *Human Physiology: from Cells to Systems*. 9th edition. Boston: Cengage Learning.
- Shiba, Y., Santangelo, A. M., & Roberts, A. C. (2016). Beyond the Medial Regions of Prefrontal Cortex in the Regulation of Fear and Anxiety. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2016.00012>
- Shin, L.M., & Liberzon, I. (2010). The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35, 169-191.

- Shin, L.M., Rauch, S.L., Pitman, R.K. (2006). Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1071, 67–79.
- Sigel, E., & Ernst, M. (2018). The Benzodiazepine Binding Sites of GABAA Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(7), 659–671.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.006>
- Somers, J.M., Goldner, E.M., Waraich, P., & Hsu, L. (2006). Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature. *Canadian Journal of Psychiatry*, 51, 100–113.
- Stepanovic-Petrovic, R.M., Micov, A.M., Tomic, M.A., Kovacevic, J.M., & Boškovic B.D. (2014). Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. *Anesthesiology*, 120, 737–750.
- Sternberg, R.J., & Sternberg, K. (2012). *Cognitive Psychology*. 6th edition. Belmont: Wadsworth.
- Straube, T., Schmidt, S., Weiss, T., Mentzel, H.J., & Miltner, W.H. (2009). Dynamic activation of the anterior cingulate cortex during anticipatory anxiety. *Neuroimage*, 44, 975–981.
- Strekalova, T., Zörner, B., Zacher, C., Sadovska, G., Herdegen, T., & Gass, P. (2003). Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes, Brain and Behavior*, 2, 3–10.
- Swick, D., & Ashley, V. (2017). Enhanced attentional bias variability in post-traumatic stress disorder and its relationship to more general impairments in cognitive control. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

- Thomaes, K., Dorrepaal, E., Draijer, N., de Ruiter, M. B., van Balkom, A. J., Smit, J. H., & Veltman, D. J. (2010). Reduced anterior cingulate and orbitofrontal volumes in child abuse-related complex PTSD. *The Journal of clinical psychiatry*, *71*(12), 1636-1644.
- Toth, M., Flandreau, E. I., Deslauriers, J., Geyer, M. A., Mansuy, I. M., Merlo Pich, E., & Risbrough, V. B. (2016). Overexpression of Forebrain CRH During Early Life Increases Trauma Susceptibility in Adulthood. *Neuropsychopharmacology*, *41*(6), 1681–1690. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.338>
- van Heukelum, S., Mars, R. B., Guthrie, M., Buitelaar, J. K., Beckmann, C. F., Tiesinga, P. H. E., Vogt, B. A., Glennon, J. C., & Havenith, M. N. (2020). Where is Cingulate Cortex? A Cross-Species View. *Trends in Neurosciences*, *43*(5), 285–299. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.03.007>
- Vogt, B. A. (2005). Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(7), 533–544. <https://doi.org/10.1038/nrn1704>
- Vogt, K. M., Ibinson, J. W., Smith, C. T., Citro, A. T., Norton, C. M., Karim, H. T., Popov, V., Mahajan, A., Aizenstein, H. J., Reder, L. M., & Fiez, J. A. (2021). Midazolam and Ketamine Produce Distinct Neural Changes in Memory, Pain, and Fear Networks during Pain. *Anesthesiology*, *135*(1), 69–82. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003774>
- Yehuda, R., & LeDoux, J. (2007). Response Variation following Trauma: A Translational Neuroscience Approach to Understanding PTSD. *Neuron*, *56*(1), 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.006>
- Yehuda, R., Hoge, C.W., McFarlane, A.C., Vermetten, E., Lanius, R.A., Nievergelt, C.M. et al. (2015). Post-traumatic stress disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*, 15057.

Wu, L.-J., Zhang, X.-H., Fukushima, H., Zhang, F., Wang, H., Toyoda, H., ... Zhuo, M. (2008). Genetic enhancement of trace fear memory and cingulate potentiation in mice overexpressing Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. *European Journal of Neuroscience*, 27(8), 1923–1932. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06183.x>

Zimmermann, K. S., Li, C., Rainnie, D. G., Ressler, K. J., & Gourley, S. L. (2018). Memory Retention Involves the Ventrolateral Orbitofrontal Cortex: Comparison with the Basolateral Amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 43(2), 373–383. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.139>